

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II



TESIS DOCTORAL

Mecanismos moleculares implicados en el efecto protector de los polifenoles de la dieta frente al estrés oxidativo y la inflamación: estudio en células intestinales y animales de experimentación

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ildefonso Rodríguez Ramiro

Directores

Luis Goya
María Ángeles Martín

Madrid, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA



**MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN EL EFECTO
PROTECTOR DE LOS POLIFENOLES DE LA DIETA FRENTE AL
ESTRÉS OXIDATIVO Y LA INFLAMACIÓN.
ESTUDIO EN CÉLULAS INTESTINALES Y ANIMALES DE
EXPERIMENTACIÓN**

ILDEFONSO RODRÍGUEZ RAMIRO

MADRID, 2012



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR II



**MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN EL EFECTO
PROTECTOR DE LOS POLIFENOLES DE LA DIETA FRENTE AL
ESTRÉS OXIDATIVO Y LA INFLAMACIÓN.
ESTUDIO EN CÉLULAS INTESTINALES Y ANIMALES DE
EXPERIMENTACIÓN.**

ILDEFONSO RODRÍGUEZ RAMIRO
MADRID, 2012

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR II



**MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN EL EFECTO
PROTECTOR DE LOS POLIFENOLES DE LA DIETA FRENTE AL
ESTRÉS OXIDATIVO Y LA INFLAMACIÓN.
ESTUDIO EN CÉLULAS INTESTINALES Y ANIMALES DE
EXPERIMENTACIÓN.**

**Trabajo de investigación presentado por Ildefonso Rodríguez Ramiro para optar
al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid (UCM)**

Vº Bueno de los directores: Vº Bueno del tutor: Vº Bueno del doctorando:

Dr. Luis Goya

Dr. Fernando Escrivá

Ildefonso Rodríguez

Dra María Ángeles Martín

Madrid, 2012



El **Dr. Luis Goya Suárez**, Investigador Científico y la **Dra. María Ángeles Martín Arribas**, Titulado Superior Especializado, del Departamento de Metabolismo y Nutrición del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) certifican que el trabajo de investigación titulado:

“Mecanismos moleculares implicados en el efecto protector de los polifenoles de la dieta frente al estrés oxidativo y la inflamación. Estudio en células intestinales y animales de experimentación”.

presentado por **Ildefonso Rodríguez Ramiro** para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid, ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Metabolismo y Nutrición del ICTAN perteneciente al CSIC.

Fdo:

Dr. Luis Goya

Fdo:

Dra. María Ángeles Martín

SEDE CIUDAD UNIVERSITARIA:

C/ JOSÉ ANTONIO NOVÁIS, 10
CIUDAD UNIVERSITARIA
28040 MADRID, ESPAÑA
TELS.: 91 544 56 07 – 91 549 23 00
FAX: 91 549 36 27

SEDE JUAN DE LA CIERVA:

C/JUAN DE LA CIERVA, 3
28006 MADRID, ESPAÑA
TELS.: 91 562 29 00
FAX: 91 564 48 53



ER-0366/2008
ALCANCE: La gestión y ejecución de proyectos y contratos de investigación en el área de ciencia y tecnología de alimentos y nutrición.

El presente trabajo ha sido financiado por el proyecto (AGL2007-64042/ALI) de la Dirección General de Investigación Científica y Técnica (DGICT) y por el programa Consolider-Ingenio 2010 (CSD2007-00063) del Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN).

Ildefonso Rodríguez Ramiro ha dispuesto de una ayuda JAE Predoctoral del personal investigador en formación del CSIC (JAE-PRE) durante el periodo 2008-2012

A mi madre

A mis hermanos

A Ana Belén

Agradecimientos

Cuando miro hacia atrás para recordar el tiempo que he pasado en el ICTAN aún no me puedo creer que hayan pasado cuatro años. El tiempo ha pasado muy rápido y ahora me encuentro escribiendo las últimas líneas de mi tesis!. Han sido cuatro años muy intensos realizando un trabajo que me ha llenado plenamente y rodeado de personas que han hecho de estos cuatro años instantes muy agradables y gratificantes. Por todos estos momentos, me gustaría dedicar mis agradecimientos a todas estas personas.

En primer lugar quiero mostrar mis más sinceros agradecimientos a mis directores de Tesis, el Dr. Luis Goya y la Dra. María Ángeles Martín por todo el tiempo, la paciencia infinita y el interés que me han dedicado durante todo este tiempo. Ha sido un gran placer aprender de su gran profesionalidad y de su experiencia y por ello las palabras de agradecimiento que les dedico no caben en todos los folios de esta tesis.

Luis, gracias por transmitirme tus conocimientos, los consejos y toda la ayuda que he necesitado con la mejor de tus sonrisas y tu buena disposición. Eres un gran científico y una magnífica persona, sencilla, humilde y cercana. Gracias por añadir la cláusula de cafés ilimitados a mi contrato y recuerda que formamos el *Team A*!!

Nines, gracias por estar siempre ahí, gracias por contar conmigo a la hora de desarrollar tus ideas más innovadoras y gracias por guiarme con gran maestría planificando y organizando con una precisión milimétrica cada uno de mis pasos. No sólo has actuado como *una jefa* también te has convertido en *una amiga* que ha intentado siempre sacar lo mejor de mí.

También quiero extender mis agradecimientos a todo el grupo de investigación. Gracias a la Dra. Laura Bravo, por todo su apoyo, el ánimo y el buen trato que siempre he recibido de su parte. De la misma manera muchas gracias a la Dra. Sonia Ramos por todas sus lecciones a pie de poyata. *Sonia* he aprendido mucho de ti y has sido un gran apoyo durante estos años. Siempre admiraré tu perseverancia, pero también tu amabilidad y tu gran corazón. Gracias por soportar mis incesantes preguntas (*y por qué...?*) e ideas (*y si...*) en el cuarto de revelado. Gracias a la Dra. Raquel Mateos, por todos esos buenos momentos que hemos tenido en los cafés y en el laboratorio. Gracias por defender que Ildefonso es un nombre bonito! A la Dra. Beatriz Sarriá, gracias también por toda su simpatía y sus buenas palabras.

Agradecimientos

La ciencia *invita* a tener una vida muy movida y unos se van y otros vienen constantemente. Por ello también quiero extender mis agradecimientos a todos aquellos que han formado o forman parte del grupo de investigación y a todos los compañeros con los que he compartido laboratorio a lo largo de este periodo de mi vida. A la Dra. Ana Belén Granado-Serrano, gracias por acordarte de mí y ponerte en contacto con Luis y Nines. Si hoy estoy aquí en parte te lo debo a ti. A la Dra. Rosana Cabello, gracias por invadir el laboratorio de alegría sevillana y por saber sacarnos una sonrisa a todos. A las nuevas incorporaciones las doctoras Myriam Amigo, Jara Pérez y María Elena Díaz y aquellas que ya se marcharon Sara Arranz e Irene Espinosa gracias por vuestro compañerismo y toda vuestra ayuda en el laboratorio. Gracias también al Dr. José Manuel Silván, que me ayuda a compensar un poco la balanza masculina en los cafés y en las comidas.

Gracias a todos los que me habéis ayudado a sobrellevar el día a día en el laboratorio: Miren, Sara, Javier, Isa, Eva, Gema, así como los que pasasteis de forma más breve pero intensa por el centro, Ben, Tony, Elena, Gema... cada uno me habéis aportado un poco de vosotros que siempre llevaré conmigo. Habrá noches *Legendarias* que nunca olvidaré, *Viercoles* que pasarán a la historia y amigos que siempre recordaré.

A todos mis compañeros de *despacho*: María, Gerardo, Silvia... gracias por ser tan buenos compañeros y por vuestra ayuda en esta última etapa tan difícil.

Agradecer al resto de los integrantes del Departamento de Metabolismo y Nutrición toda la ayuda y el compañerismo que me han prestado en mi paso por el ICTAN.

Gracias a Isabel y M^a Rosa por la ayuda que me han proporcionado en estos años.

Agradecer a los Drs. Fernando Escrivá, Carmen Álvarez, Elisa Fernández del Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular II de la Facultad de Farmacia de la UCM toda la ayuda que me han prestado cada vez que he aparecido por sus pasillos. También a Ester y a Juan les agradezco su ayuda y amabilidad.

A los Drs. Elvira López y Ángel Agís de la Sección Departamental de Fisiología de la Facultad de Farmacia de la UCM les agradezco enormemente la colaboración que realizaron con nosotros para obtener los trabajos de histología que realizamos con los animales de experimentación. También les quiero agradecer toda la ayuda y la información que me han dado.

Mi familia siempre ha estado a mi lado tanto en lo bueno como en lo malo, por eso también ellos se merecen una mención especial de agradecimiento. Gracias por todo Mamá, todo lo que somos o seamos te lo deberemos siempre a ti. Espero estar a la altura del sacrificio que has hecho para sacarnos adelante. También agradecer a mis hermanos Lelé y Juan el estar siempre disponibles para poder contar con ellos siempre que los necesito. De la misma forma he podido contar siempre tanto con mi abuela como con mis tíos Paco y Manoli, por ello también quiero dejar constancia de lo agradecido que me siento por ello.

Gracias a todos mis amigos por *llevarme al sur para que no perdiese el norte*.

Gran parte de la brevedad con la cual han transcurrido estos cuatro años te los debo a ti Ana Belén. Si la ciencia ha llenado mi cabeza con células, polifenoles y gráficas, tu has llenado mi corazón con tu amor tu alegría y tu ilusión. Realmente me has ayudado más de lo que te imaginas, porque no se que habría sido de mi sin tus palabras al final de cada día. Muchas gracias por todo tu amor y tu cariño!! Te quiero.

“Los sueños y la perseverancia son una poderosa combinación”

(William Longgood)

Índice

Introducción	1
1. Compuestos fenólicos de la dieta	3
1.1 Clasificación y estructura	3
1.1.1 Flavonoides	3
1.1.2 Ácidos fenólicos.....	6
1.1.3 Alcoholes fenólicos.....	6
1.1.4 Estilbenos	6
1.1.5 Lignanos.....	7
1.2 Ingesta, biodisponibilidad y metabolismo de los polifenoles de la dieta.....	7
1.3 Actividad biológica de los polifenoles de la dieta	9
1.3.1 Efectos antioxidantes	9
1.3.2 Efectos cardiovasculares	10
1.3.3 Efectos anticancerígenos	10
1.3.4 Efectos anti-diabéticos	10
1.3.5 Efectos anti-envejecimiento	10
1.3.6 Efectos neuroprotectores	11
1.3.7 Efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores	11
1.3.8 Efectos antimicrobianos	11
1.3.9 Otros efectos	12
2. Estrés oxidativo y enfermedad	12
2.1 Estrés oxidativo y daño directo a macromoléculas.....	12
2.2 Mecanismos de defensa antioxidantes	14
2.2.1 Mecanismos de defensa antioxidantes no enzimáticos.....	14
2.2.2 Mecanismos de defensa antioxidantes enzimáticos.....	15
2.3 Funciones fisiológicas y patológicas de los ROS	17
2.3.1 Vías de señales implicadas en las enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo	18
2.3.1.1 Proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs)	18
2.3.1.2 Vía de la fosfatidil-inositol-3-quinasa y su proteína quinasa AKT (PI3K/AKT)	20
2.3.1.3 Proteína quinasa C (PKC).....	20
2.3.2 Estrés oxidativo y apoptosis	21
2.3.3 Factores de transcripción implicados en las enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo	23
2.3.3.1 Factor de transcripción relacionado con el factor nuclear eritroide 2p45 (Nrf2).....	23
2.3.3.2 Factor nuclear kappa B (NF-κB)	24
3. Patologías del tracto intestinal asociadas con el estrés oxidativo y la inflamación	26
3.1 Fisiología e histología del epitelio del colon	26
3.1.1 Modelo de estudio del epitelio intestinal in vitro: línea celular Caco-2	29

3.2 Alteraciones del estado redox intestinal y patologías intestinales	30
3.2.1 Estrés oxidativo y permeabilidad intestinal.....	31
3.2.2 Estrés oxidativo y desarrollo del proceso de inflamación intestinal.....	31
3.2.3 Estrés oxidativo e iniciación de la carcinogénesis colónica	32
3.3 Modelo de daño pre-neoplásico inducido en animales de experimentación.....	33
4. Efectos saludables del cacao	35
4.1 Polifenoles del cacao	35
4.2 Efectos biológicos del cacao	36
4.2.1 Efectos del cacao sobre el sistema cardiovascular	36
4.2.2 Efectos del cacao sobre la carcinogénesis	37
4.2.3 Efectos del cacao sobre la respuesta inmune.....	37
4.2.4 Efectos neuroprotectores del cacao	38
4.3 Efectos de los flavanoles del cacao en el epitelio del colon	38
Objetivos generales	41
Resultados	45
Capítulo 1: Evaluación de la efectividad de los flavonoides mayoritarios del cacao en la protección intestinal en un modelo de estrés oxidativo en las células intestinales de colon Caco-2.....	47
Resumen.....	49
Artículo 1	53
Capítulo 2: Estudio de los mecanismos moleculares de protección de los flavonoides del cacao frente al estrés oxidativo inducido por un tóxico alimentario en células intestinales Caco-2.....	63
Resumen.....	65
Artículo 2	69
Artículo 3	79
Capítulo 3: Estudio del potencial efecto protector de una dieta enriquecida en cacao frente al inicio del cáncer de colon en un modelo animal <i>in vivo</i>	91
Resumen.....	93
Artículo 4	97
Datos suplementarios artículo 4	103
Artículo 5	117
Discusión.....	151
1. Efecto de los flavonoides mayoritarios del cacao en la protección intestinal en un modelo de estrés oxidativo en células intestinales Caco-2.....	153
2. Mecanismos moleculares de protección de los flavonoides del cacao frente al estrés oxidativo inducido por un tóxico alimentario en células intestinales Caco-2.....	155

2.1 La acrilamida induce estrés oxidativo y apoptosis en las células intestinales Caco-2	156
2.2 Los polifenoles del cacao previenen el estrés oxidativo y la apoptosis inducidos por la acrilamida en las células intestinales Caco-2	158
2.3 Mecanismos moleculares inducidos por la procianidina B2 implicados en el refuerzo de los niveles de expresión de la isoforma P1 de la enzima antioxidante/detoxificante GST.....	160
3. Efecto protector de una dieta enriquecida en cacao frente al inicio del cáncer de colon en un modelo animal <i>in vivo</i>	163
3.1 Efectos antioxidantes de la dieta enriquecida en cacao	165
3.2 Efectos anti-proliferativos de la dieta enriquecida en cacao.....	166
3.3 Efectos anti-inflamatorios de la dieta enriquecida en cacao.....	167
3.4 Efectos apoptóticos de la dieta enriquecida en cacao	169
 Conclusiones	 173
 Bibliografía.....	 179

Abreviaturas

8-OH-dG: 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina
Ác: ácido
ACF: foco de criptas aberrantes
AGEs: productos finales de glicación avanzada
AOM: azoximetano
AP-1: proteína activadora-1
APC: adenomatous polyposis coli
ARE: elemento de respuesta antioxidante
ARNm: ARN mensajero
ATP: adenosina trifosfato
Bcl-2: gen 2 del linfoma de células B
CFTR: regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística
CPB/p300: proteína de unión CREB/p300
COX-2: ciclooxigenasa-2
CPE: extracto polifenólico de cacao
CU: colitis ulcerosa
Cul-3: culina 3
Cys: L-cisteína
DEN: dietil-N-nitrosamina
DMH: 1,2-dimetilhidracina
DSS: sulfato de dextrano sódico
EdC: enfermedad de Crohn
EC: epicatequina
ECG: epicatequina-3-galato
EGCG: epigallocatequina-3-galato
EGF: factor de crecimiento epidérmico
EII: enfermedades inflamatorias intestinales
EpRE: elemento de respuesta electrofílica
ERKs: quinasas reguladas por señales extracelulares
FOXO: factor de transcripción *forkhead*
 γ -GCS: γ -glutamilcisteína sintetasa
Glu: L-glutámico
Gly: glicina
GPx: glutathione peroxidasa
GR: glutathione reductasa
GSH: glutathione reducido
GS-R: conjugados de glutathione con xenobióticos
GSS: sintasa de glutathione
GSSG: glutathione oxidado
GST: glutathione S transferasa

Abreviaturas

GSTP1: glutathion S transferasa isoforma P1
HIF: factor de transcripción inducible por hipoxia
HNE: hidroxinonenal
HSF1: factor de transcripción inducido por cambios térmicos 1
IKK: quinasa del inhibidor del elemento kappa B
IL-1 β : interleuquina 1 β
iNOS: óxido nítrico sintasa inducible
I κ B: inhibidor del elemento kappa B
JNKs: quinasas c-Jun N-terminal
Keap-1: proteína represora asociada a ECH
LDL: lipoproteína de baja densidad
LPS: lipopolisacáridos
MAPKs: proteínas quinasas activadas por mitógenos
MDA: malondialdehído
MEK1: quinasa de la MAPK/ERK1
MTF1: Factor de transcripción activado por metales 1
NAC: N-acetilcisteína
NADP⁺: nicotinamida-adenina-dinucleotido-fosfato oxidada
NADPH: nicotinamida-adenina-dinucleotido-fosfato reducida
NFAT: factor nuclear de células T activadas
NF- κ B: factor de transcripción nuclear kappa B
NO: óxido nítrico
Nrf2: factor de transcripción relacionado con el factor nuclear eritroide 2p45
O₂⁻: anión superóxido
OH⁻: radical hidroxilo
p38: quinasa p38
PB2: procianidina B2
PCNA: antígeno nuclear de células en proliferación
PI3K: fosfatidil-inositol-3-quinasa
PKC: proteína quinasa C
PUFAs: ácidos grasos poliinsaturados
R: compuestos electrofílicos y xenobióticos
ROH: hidróxido
ROOH: hidroperóxido orgánico
ROS: especies reactivas del oxígeno
-SH: grupo tiol
t-BOOH: *tert*-butil hidroperóxido
TNF- α : factor de necrosis tumoral-alpha
TUNEL: marcaje de la UTP final por la transferasa deoxinucleotidil terminal.

Introducción

1. Compuestos fenólicos de la dieta

Los compuestos fenólicos son el mayor grupo de fitoquímicos dentro del reino vegetal. Son muy abundantes en alimentos de la dieta como las frutas, las verduras, el chocolate y las legumbres junto con el aceite de oliva y las bebidas como el vino, el té o el café¹. Los estudios epidemiológicos llevados a cabo en la última década sugieren que el consumo de una dieta rica en estos compuestos fenólicos está asociado con una disminución del riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares², ciertos tipos de cáncer³ y enfermedades degenerativas⁴. En este sentido, los posibles efectos beneficiosos que los compuestos fenólicos pueden producir en la salud han despertado un gran interés científico por identificar y clasificar su amplia y compleja variedad de estructuras químicas. Del mismo modo ha resultado igualmente atractivo conocer cuales de estos compuestos están presentes y en qué proporción en los alimentos; así como estudiar la forma en que son absorbidos y metabolizados para llegar a los distintos tejidos en los que ejercen sus efectos beneficiosos.

1.1 Clasificación y estructura

Los compuestos fenólicos son uno de los grupos de metabolitos secundarios más numerosos y ubicuos en el reino vegetal. Existen más de 8000 estructuras fenólicas identificadas hasta el momento (revisado en Pandey & Rizvi, 2009⁵) que incluyen desde moléculas con un solo anillo fenólico a compuestos altamente polimerizados, que presentan numerosos anillos fenólicos. En general, todos ellos son comúnmente designados como polifenoles, a pesar de que algunos solo presentan un único anillo fenólico. Atendiendo a su estructura química, los compuestos fenólicos o polifenoles son clasificados en cinco grandes grupos: flavonoides, ácidos fenólicos, alcoholes fenólicos, estilbenos y lignanos¹ (Figura 1).

1.1.1 Flavonoides

Los flavonoides se caracterizan por tener una estructura básica denominada difenilpropano ($C_6-C_3-C_6$) formada por 2 anillos aromáticos (A y B) unidos a través de 3 átomos de carbono que normalmente forman un heterociclo oxigenado (anillo C). A su vez el estado de oxidación del anillo C define seis subfamilias de flavonoides: flavonas, flavanonas, isoflavonas, antocianidinas, flavonoles, y flavanoles¹ (Figura 2).

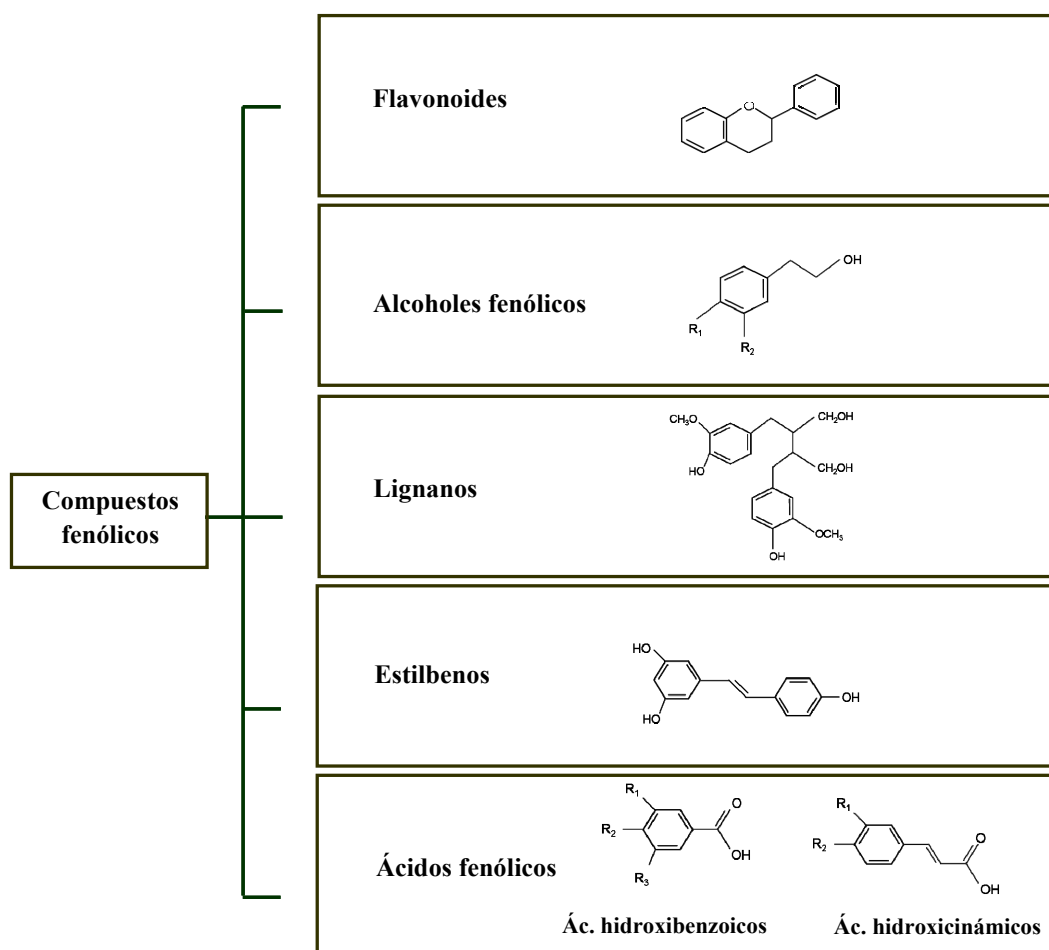


Figura 1.- Esquema general de los compuestos fenólicos. (Adaptado de D'Archivio y colaboradores, 2007¹)

Las *flavonas* sólo se encuentran en dos fuentes comestibles como son el perejil y el apio aunque también existen abundantes cantidades en la piel de las frutas¹.

Las *flavanonas* sólo están presentes en altas concentraciones en frutas cítricas, aunque también puede ser encontradas en el tomate y en ciertas plantas aromáticas como la menta⁶.

Las *isoflavonas* presentan una estructura química que es similar a los estrógenos y pueden unirse a sus receptores por lo que a veces son denominadas como fitoestrógenos. Se encuentran en casi todas las plantas leguminosas, siendo la soja y los productos derivados de ella la principal fuente de isoflavonas¹.

Las *antocianidinas* son pigmentos solubles en agua y son los responsables de la mayoría de los colores rojos, azules y púrpuras de las flores, frutas y verduras así como de otras partes de las plantas⁷. Las antocianidinas se encuentran en las plantas principalmente en su forma glicosilada, forma que es denominada como antocianina⁸.

Los **flavonoles** constituyen el grupo de flavonoides más ubicuo en los alimentos, siendo la quercetina el compuesto más representativo. La principal fuente de flavonoles es la cebolla, aunque también son abundantes en la col rizada, el puerro, el brócoli y los arándanos y en bebidas como el té y el vino tinto. La biosíntesis de flavonoles es estimulada por la radiación solar, por lo que estos compuestos se acumulan mayoritariamente en las partes más externas de las frutas⁹.

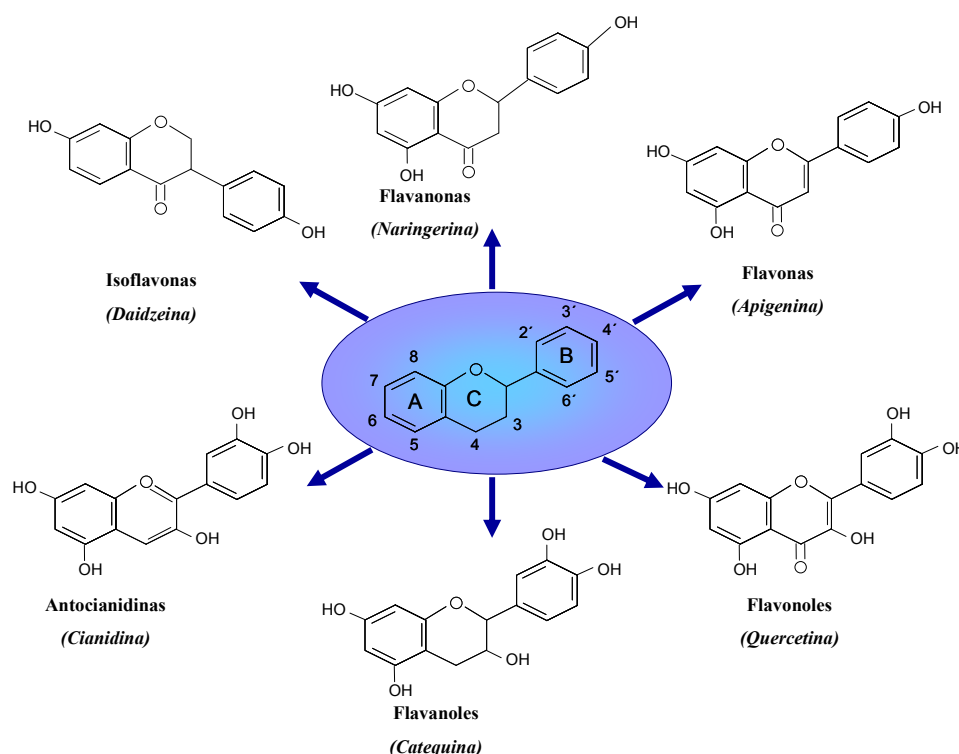


Figura 2.- Estructuras químicas de las distintas subclases de flavonoides. (Adaptado de Pandey & Rizvi, 2009⁵)

Los **flavonoles** se pueden encontrar de 2 formas en la naturaleza, como monómeros o como polímeros. Además, se caracterizan porque son los únicos flavonoides que no aparecen en la forma glicosilada en los alimentos¹. El cacao es el alimento con un mayor contenido en flavonoles, aunque el té verde y el vino también contienen cantidades importantes¹⁰. Los flavonoles más representativos del grupo son las catequinas y epicatequinas, de ahí que los monómeros sean comúnmente denominados catequinas. A su vez, los polímeros constituidos por unidades de catequinas son denominados procianidinas. Dada la dificultad para evaluar el contenido de procianidinas en los alimentos por su amplio rango de estructuras (las catequinas se agrupan como dímeros, trímeros, oligómeros y polímeros) y de sus pesos moleculares los datos en la literatura se refieren mayoritariamente a dímeros y trímeros de

catequinas, que son tan abundantes como las propias catequinas¹¹. Son precisamente las procianidinas las responsables del carácter astringente de las frutas (manzanas, uvas, bayas...) y de las bebidas (vino, té, cerveza) y del amargor tanto del cacao como del chocolate puro¹².

1.1.2 Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos atendiendo a su estructura pueden clasificarse a su vez en dos tipos: derivados de ácidos benzoicos y derivados de ácidos cinámicos. Ambos están formados por un anillo fenólico diferenciándose entre ellos en el número de átomos de carbono de los sustituyentes¹³.

Los **ácidos hidroxibenzoicos** (C₆-C₁) como el ácido gálico y el ácido protocatéquico son encontrados en muy pocos alimentos de origen vegetal, por lo que hasta hace unos años han sido poco estudiados. Sin embargo son abundantes en ciertos frutos rojos como las moras y en bebidas como el té¹.

Los **ácidos hidroxicinámicos** (C₆-C₃) pocas veces son encontrados en su forma libre en los alimentos. Sin embargo, si que suelen aparecer glicosilados o como ácidos quínicos, siquínicos o tartáricos. El ácido clorogénico que es una combinación del ácido cafeico y quínico, es frecuentemente encontrado en muchos tipos de frutas y en altas concentraciones en el café¹⁴.

1.1.3 Alcoholes fenólicos

El tirosol (4-hidroxifeniletanol) y el hidroxitirosol (3,4 dihidroxifeniletanol) están constituidos por un anillo fenólico unido a un sustituyente que es un grupo etanol (C₆-C₂). Son los principales alcoholes fenólicos y se encuentran principalmente en el aceite extra virgen de oliva. El tirosol también se encuentra en bebidas como el vino tinto, en el vino blanco y en la cerveza^{1,15}.

1.1.4 Estilbenos

Los estilbenos están constituidos por dos anillos fenilos conectados por un puente de metileno de dos carbonos (C₆-C₂-C₆)⁵. Estos compuestos se encuentran en poca cantidad en la dieta humana. El principal representante es el resveratrol que se encuentra en su forma glicosilada. Éste es producido por las plantas en respuesta a condiciones de estrés y por las infecciones de patógenos¹⁶. Es abundante en la piel de las uvas tintas y por consiguiente en el zumo de uva y en el vino tinto¹⁷.

1.1.5 Lignanós

Los lignanos son producidos por la dimerización oxidativa de dos unidades de fenilpropano ($C_6-C_3-C_3-C_6$). En la naturaleza se encuentran principalmente en su forma libre mientras que las formas glicosiladas constituyen una minoría¹.

1.2 Ingesta, biodisponibilidad y metabolismo de los polifenoles de la dieta

Estimar la ingesta diaria de polifenoles de una dieta es un elemento esencial para poder relacionar los efectos saludables con la cantidad y el tipo de alimentos ingeridos. Hasta el momento las herramientas que existen para determinar la ingesta diaria son principalmente cuestionarios de frecuencia del consumo de alimentos, que indudablemente presentan grandes limitaciones y están sujetos a la buena voluntad de los participantes de los estudios de intervención, cuyo estilo de vida no está estrictamente controlado. Una vez obtenida la información, se puede estimar el aporte de los polifenoles ingeridos en estos alimentos mediante consultas en bases de datos de composición de alimentos¹⁸. Un ejemplo de ellas es la base de datos *Phenol-Explorer* (<http://www.phenol-explorer.eu/>)¹⁹, donde puede estimarse el contenido aproximado de polifenoles en ciertos alimentos de la dieta. Aun así, estos datos son tan solo orientativos, pues el contenido de polifenoles en los alimentos puede variar en función de los factores ambientales a los que hayan estado sometidos, el procesamiento industrial o el realizado durante la preparación culinaria de los mismos²⁰. De forma general, algunos autores estiman que la ingesta de polifenoles en la dieta puede llegar a ser de hasta 1 g/día²¹⁻²².

Sin embargo, más importante aún que el contenido polifenólico de los alimentos de la dieta, es la biodisponibilidad que van a tener dichos polifenoles una vez son ingeridos. Existen muchas definiciones sobre el término biodisponibilidad, sin embargo la más adecuada desde un punto de vista nutricional podría definirse como la fracción de un nutriente o compuesto ingerido que llega al sistema circulatorio y a los tejidos dianas (específicos) donde pueden ejercer su acción biológica²³.

Los polifenoles pueden ser absorbidos en el intestino en su forma nativa o aglicona (sin llevar unidos residuos de azúcar), no obstante la mayoría de los polifenoles se encuentran presentes en los alimentos en forma de éster, glicosilados o de forma polimérica, lo cual impide su absorción¹. Por ello, antes de ser absorbidos estos compuestos deben ser hidrolizados por enzimas intestinales o por la microflora colónica²⁴. Durante el proceso de absorción, los polifenoles sufren numerosas

modificaciones químicas. De hecho, el metabolismo de los polifenoles se produce a través de una secuencia de reacciones comunes que es similar al proceso de detoxificación metabólica que sufren muchos xenobióticos para reducir su potencial toxicidad y para aumentar su carácter hidrofílico de manera que puedan ser rápidamente excretados¹. En concreto, los polifenoles, son primero conjugados en las células intestinales y posteriormente en el hígado, donde sufren más procesos de metilación, sulfatación y/o glucuronidación²⁵ (Figura 3).

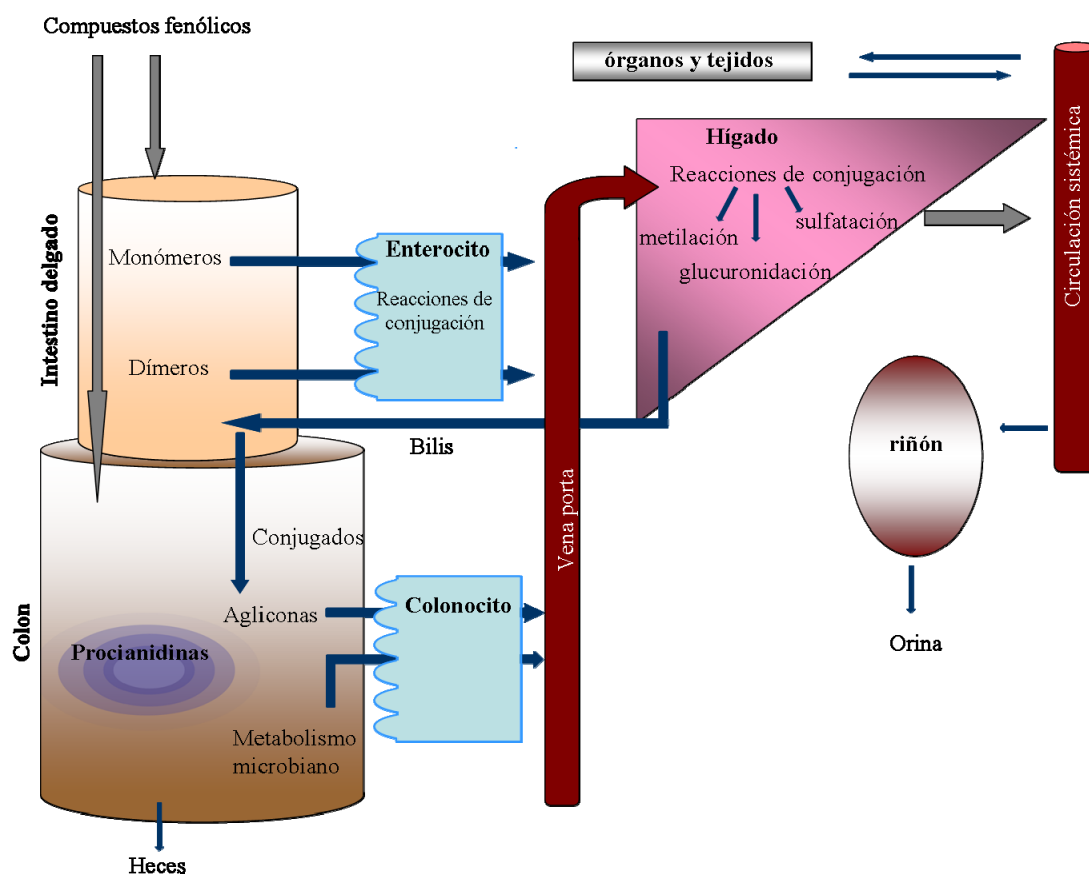


Figura 3.- Esquema del metabolismo y la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos. (Adaptado de Monagas y colaboradores, 2010²⁵)

Las procianidinas difieren del resto de los polifenoles por su forma polimérica y su alto peso molecular. Esta particular característica dificulta la absorción a través de la barrera intestinal y son muchos los dímeros, trímeros y polímeros fenólicos que llegan al colon inalterados y permanecen ahí durante un periodo prolongado de tiempo. Finalmente, en el colon pueden ser despolimerizados, metabolizados por la microflora colónica o excretados por las heces²⁵.

El resultado de todos estos procesos de conjugación da lugar a la absorción de parte de estos compuestos fenólicos y de numerosos de sus derivados a la vena porta. Los compuestos fenólicos más simples, tales como los ácidos fenólicos, pueden encontrarse en mayor concentración *in vivo* que en el alimento en sí antes de ser ingerido²⁶, debido a que muchos de ellos son el producto de la rotura de polifenoles poliméricos²⁷. Una vez en la vena porta, son transportados hasta el hígado, donde son susceptibles de sufrir más procesos de conjugación. Desde el hígado, los metabolitos y los polifenoles intactos pasan al torrente sanguíneo por donde circulan unidos a proteínas, principalmente a albúmina, para ser distribuidos por tejidos dianas y ser finalmente eliminados por la orina. Se ha estimado que las concentraciones en plasma de los polifenoles en su forma nativa, raras veces superan el rango de 1 μM ²⁸⁻²⁹, mientras que la concentración de los metabolitos oscila entre 0,5-30 μM ²⁵ dependiendo del tipo de dieta y de la composición de la microflora de cada individuo. Además, su mantenimiento en el torrente sanguíneo está sujeto a una ingestión constante de alimentos ricos en estos compuestos¹.

1.3 Actividad biológica de los polifenoles de la dieta

Gran parte de la literatura científica apoya la idea de que el estrés oxidativo está relacionado con la patogénesis de numerosas enfermedades y que una dieta rica en polifenoles contribuye a su prevención⁵. Durante muchos años se ha pensado que los polifenoles protegían a las células del estrés oxidativo a través de la neutralización directa de radicales libres. Sin embargo, hoy en día este concepto parece una visión muy simplificada de su modo de acción. Actualmente se sabe que las células responden a los efectos de los polifenoles principalmente a través de las interacciones directas con receptores o con proteínas que intervienen en la transducción de señales. De esta manera, los polifenoles modulan estas vías de señales desencadenando toda una serie de efectos beneficiosos^{22,30-31}.

1.3.1 Efectos antioxidantes

Los polifenoles pueden ejercer un efecto protector antioxidante por medio de la neutralización directa de radicales libres y de la quelación de metales. Además, mediante la interacción con las vías de señales celulares pueden estimular las defensas antioxidantes endógenas de las células. En conjunto, a través de estos mecanismos de

protección celular, se limita el riesgo de daño oxidativo producido por los radicales libres que contribuyen a la patogénesis de diversas enfermedades^{24,32}.

1.3.2 Efectos cardiovasculares

Diversos estudios han sugerido que los polifenoles ejercen efectos beneficiosos en el sistema cardiovascular a través de la estimulación de las defensas antioxidantes, la disminución de la presión sanguínea sistólica, mejorando la función endotelial, inhibiendo la agregación plaquetaria, disminuyendo la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y reduciendo la respuesta inflamatoria^{4,24}.

1.3.3 Efectos anticancerígenos

Numerosos compuestos polifenólicos tienen efectos duales en la modulación de la proliferación celular de manera dosis dependiente³³. Así, el consumo moderado de una dieta diaria rica en frutas y verduras puede ayudar a prevenir el establecimiento y la progresión de numerosos tipos de cáncer. Muchos de los polifenoles encontrados en estos alimentos ejercen efectos protectores contra el desarrollo del cáncer, especialmente en el tracto gastrointestinal donde los polifenoles pueden encontrarse en grandes concentraciones^{3,34}. Por otro lado, los efectos pro-oxidantes de los polifenoles, alcanzados con dosis farmacológicas pueden inducir apoptosis evitando el desarrollo del crecimiento tumoral³⁵.

1.3.4 Efectos anti-diabéticos

Los trastornos en el metabolismo de la glucosa ocasionan ciertos desequilibrios fisiológicos que pueden llegar a producir hiperglucemia y posteriormente diabetes. Los polifenoles pueden afectar a la glucemia por diferentes mecanismos que incluyen la inhibición de la absorción de glucosa en el intestino o su captación por parte de los tejidos periféricos⁵. Igualmente, algunos polifenoles pueden prevenir la hiperglucemia actuando como secretagogos de la insulina en las células beta-pancreáticas, contribuyendo en la disminución de los niveles plasmáticos de glucosa³⁶.

1.3.5 Efectos anti-envejecimiento

Con la edad se van acumulando numerosos daños perjudiciales en las células y en los tejidos que aumentan el riesgo de padecer ciertas enfermedades. Entre estos daños deletéreos, destacan los oxidativos, junto con aquellos que conducen a una

disminución de los mecanismos antioxidantes y de reparación celular. Un estilo de vida con una dieta rica en polifenoles puede disminuir o retrasar la acumulación de daños oxidativos debido a sus potentes efectos antioxidantes (revisado en Pandey & Rivzi, 2009⁵). Además, se piensa que en concreto el resveratrol puede presentar los mismos efectos beneficiosos que la restricción calórica, aumentando la esperanza de vida, pero sin necesidad de reducir el consumo de alimentos³⁷.

1.3.6 Efectos neuroprotectores

La acumulación del daño oxidativo en las células neuronales durante el proceso del envejecimiento puede promover una excesiva muerte celular y ocasionar enfermedades neurodegenerativas tales como el Alzheimer o el Parkinson^{4,38-39}. Cada vez más estudios afirman que ciertos compuestos fenólicos que consiguen atravesar la barrera hematoencefálica pueden proteger frente a la apoptosis neuronal asociada con la patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas³⁹⁻⁴⁰. De esta manera, pueden prevenir los daños neuronales ocasionados por el estrés oxidativo o el inducido por el péptido alpha-beta amiloide (en el caso del Alzheimer) (revisado en Vauzour y colaboradores, 2010⁴).

1.3.7 Efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores

Los efectos inmunomoduladores de los polifenoles en muchos casos están relacionados con sus acciones antioxidantes²⁴. A través de las vías de señales y de la modulación de las defensas antioxidantes, ciertos polifenoles pueden inhibir la liberación de factores proinflamatorios causantes de la génesis de diversas enfermedades inflamatorias^{24,41}.

1.3.8 Efectos antimicrobianos

Ciertos polifenoles han demostrado tener una potencial efecto antibacteriano, antifúngico y antiviral (revisado en Rodrigo y colaboradores, 2011²⁴). Así, se ha descrito que algunos polifenoles impiden el crecimiento de patógenos como *Listeria monocytogenes* o *Candida albicans*²⁴. Entre las acciones antivirales se ha visto que los polifenoles del té inhiben la entrada del virus HIV-1 dentro de sus células diana⁵.

1.3.9 Otros efectos

En general, los polifenoles pueden llevar a cabo otros efectos, de este modo algunos pueden proteger la piel frente a las radiaciones solares, otros pueden mejorar la sintomatología de enfermos de asma y otros como las isoflavonas pueden tener funciones endocrinas en mujeres post-menopáusicas ejerciendo efectos beneficiosos frente a la osteoporosis⁵.

2. Estrés oxidativo y enfermedad

En las células, en condiciones fisiológicas, existe un equilibrio entre la generación de las especies reactivas del oxígeno (comúnmente denominados ROS por sus siglas del inglés *reactive oxygen species*) y su neutralización por parte de las defensas endógenas antioxidantes. En esta situación de homeostasis, las vías de señalización celular sensibles a los cambios redox pueden realizar sus funciones de forma adecuada favoreciendo la supervivencia celular. Sin embargo, cuando se rompe la homeostasis redox a favor de un aumento de los ROS, la célula entra en una situación de estrés oxidativo. En estas condiciones, las principales macromoléculas celulares (ADN, proteínas y lípidos) pueden sufrir daños oxidativos y las vías de señales sensibles a los cambios redox pueden producir respuestas anómalas que conducen a una muerte celular excesiva e incluso al desarrollo de enfermedades³⁸.

2.1 Estrés oxidativo y daño directo a macromoléculas

El oxígeno es indispensable para la supervivencia de un ser vivo. Más del 90% del oxígeno que es captado por una célula animal es usado en la mitocondria para producir la mayor parte de la energía (adenosina trifosfato, (ATP)) requerida para la supervivencia celular. Sin embargo, como consecuencia del metabolismo celular se producen especies reactivas del oxígeno⁴². Los ROS son especies químicas que presentan electrones desapareados, lo cual les confiere inestabilidad y una extremada reactividad pro-oxidante con otras moléculas. El metabolismo mitocondrial del oxígeno es la principal fuente endógena de generación de ROS. Aproximadamente entre el 1-2% del oxígeno captado en la mitocondria es transformado de forma residual en ROS⁴³. No obstante, los ROS también pueden aparecer en la célula por fuentes exógenas, debido a las interacciones de compuestos xenobióticos con la propia célula⁴⁴. Cuando se produce un desequilibrio en el estado redox celular a favor del carácter pro-oxidante, producido por los ROS, la célula entra en una situación de estrés oxidativo. En esta situación, los

ROS pueden interaccionar con macromoléculas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (ADN) oxidando sus estructuras químicas y causando daños en ellas⁴⁵.

La peroxidación lipídica es el proceso oxidativo que resulta de una serie de reacciones en cadena en la que un solo radical libre puede causar la oxidación de un gran número de moléculas de la membrana, como los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs). La peroxidación de los lípidos de la membrana celular puede producir alteraciones en las membranas celulares⁴⁶. El hidroxinonenal (HNE) y el malondialdehído (MDA) son dos de los principales subproductos electrofílicos producidos durante el estrés oxidativo, siendo el MDA comúnmente utilizado como marcador de peroxidación lipídica⁴⁶.

La oxidación de los grupos sulfuro de las proteínas y la formación de grupos carbonilos también puede disminuir la viabilidad celular a través de la pérdida de la funcionalidad de numerosas enzimas, receptores celulares o de proteínas implicadas en la señalización celular^{45,47}. Además, durante la oxidación de proteínas, se pueden producir ciertas reacciones secuenciales, denominadas reacciones de Maillard entre carbohidratos y grupos amino de las proteínas. Como resultado de ello, se pueden formar productos finales de glicación avanzada (del inglés, *advanced glycation end products*, AGEs), caracterizados por su alta reactividad electrofílica y que producen a su vez una mayor generación de ROS⁴⁸.

El daño oxidativo a los ácidos nucleicos pone en peligro la supervivencia celular a través de la modificación de la expresión génica⁴⁵. Los ROS pueden producir roturas en las cadenas de ADN, modificaciones en la deoxirribosa o sobre las bases púricas y pirimidínicas. Igualmente, el daño oxidativo puede dar lugar a la formación de agregados de ADN o de complejos de ADN-proteína⁴⁹⁻⁵⁰; los ROS también pueden reducir la expresión de las proteínas a través del silenciamiento epigenético (vía metilación del ADN y de las histonas)⁵¹⁻⁵². Además, como consecuencia del daño en el ADN nuclear, se pueden activar vías dependientes de *p53* de respuesta a daños en el ADN que realizan procesos de parada de ciclo celular, apoptosis y senescencia celular⁴⁷.

Por último, los ROS asimismo pueden producir daños sobre las macromoléculas de la mitocondria, disminuyendo la efectividad en la cadena de transporte de electrones. Como consecuencia en los fallos de la cadena de transporte de electrones se puede producir un aumento de la generación de los ROS, la disfunción mitocondrial, la disminución de la síntesis de ATP y finalmente incluso la muerte celular⁵³.

2.2 Mecanismos de defensa antioxidantes

Para contrarrestar los efectos pro-oxidantes de los radicales libres, las células eucariotas cuentan con unos mecanismos de defensa antioxidantes muy conservados evolutivamente. La función principal de estos mecanismos es mantener la homeostasis celular contrarrestando el exceso de ROS intracelular y su consecuente efecto pro-oxidante para la célula. Los mecanismos endógenos de defensa antioxidante pueden agruparse en dos clases: mecanismos de defensa antioxidante no enzimáticos y enzimáticos.

2.2.1 Mecanismos de defensa antioxidantes no enzimáticos

El glutathion constituye el principal y más importante mecanismo de defensa frente al estrés oxidativo. En su forma reducida es un tripéptido formado por los aminoácidos L-glutámico (Glu), L-cisteína (Cys) y glicina (Gly).

El glutathion es el antioxidante no-proteico y ubicuo más abundante en las células. En el interior celular se encuentra en concentraciones milimolares y entre el 85-90% se encuentra libremente distribuido por el citosol, donde es sintetizado. Sin embargo, también es frecuente encontrarlo en el interior de orgánulos como la mitocondria, los peroxisomas, la matriz nuclear o el retículo endoplasmático⁵⁴.

Los cambios en el equilibrio entre la forma de glutathion reducido (GSH) y glutathion oxidado (GSSG) son considerados determinantes en el estado redox celular. De este modo el glutathion está implicado en diversas reacciones fisiológicas incluyendo la señalización celular, el metabolismo de xenobióticos, las reacciones de intercambio tiol/sulfuro y como importante reservorio de cisteína⁵⁴.

El glutathion puede neutralizar directamente una amplia gama de radicales libres incluyendo el anión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo (OH \cdot), el singlete de oxígeno y radicales de proteínas o ADN a través de la donación del electrón de su forma reducida y pasando así a su forma oxidada.

En situaciones de estrés oxidativo, la acumulación de GSSG puede llegar a ser tóxica para la célula, en cuyo caso provoca la inducción de la apoptosis a través de la interacción con señales de muerte celular⁵⁵⁻⁵⁶. En este sentido, diversos estudios han mostrado que numerosas enfermedades están relacionadas con la disminución del GSH que se produce durante el estrés oxidativo celular⁵⁷⁻⁵⁸ (Tabla 1). Por tanto, el equilibrio GSH/GSSG es vital para la homeostasis celular, siendo el GSSG generado en el estado redox normal no superior al 5% respecto al glutathion total⁵⁶.

Tabla 1.- Biomarcadores de daño oxidativo asociados con enfermedades humanas. MDA, malondialdehído; GSH, glutathion reducido; GSSG, glutathion oxidado; 8-OH-dG, 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (marcador de daños al ADN); HNE, hidroxinonenal; AGE, productos finales de glicación avanzada; EII, enfermedades inflamatorias intestinales; CU, colitis ulcerosa; EdC, enfermedad de Crohn (Adaptada de Valko y colaboradores, 2007⁵⁰).

Enfermedad/Biomarcadores	
Cáncer	EII (CU & EdC)
↑ MDA ↓ Ratio GSH/GSSG ↑ 8-OH-dG	↓ Ratio GSH/GSSG ↑ Peroxidación lipídica ↑ 8-OHdG
Enfermedad cardiovascular	Isquemia/reperfusión
↑ HNE ↓ Ratio GSH/GSSG ↑ Isoprostanos F2	↓ Ratio GSH/GSSG ↑ Isoprostanos F2
Artritis reumatoide	Diabetes mellitus
↓ Ratio GSH/GSSG ↑ Isoprostanos F2	↑ MDA ↓ Ratio GSH/GSSG ↑ Isoprostanos F2 ↑ AGE
Alzheimer	
↑ HNE ↑ MDA ↓ Ratio GSH/GSSG ↑ Isoprostanos F2 ↑ AGE	

2.2.2 Mecanismos de defensa antioxidantes enzimáticos

Los mecanismos de defensa antioxidantes enzimáticos consisten en una serie de enzimas que actúan de manera coordinada contrarrestando y protegiendo el estado celular frente a posibles agentes pro-oxidantes y a xenobióticos. Puesto que el glutathion es considerado uno de los principales determinantes del estado redox intracelular, se profundizará en las defensas enzimáticas relacionadas con su metabolismo (Figura 4); no obstante existen otras defensas enzimáticas de importancia relevante en la neutralización de los ROS y en la prevención de su carácter oxidante para la célula.

La **glutathion peroxidasa (GPx)** es la enzima que cataliza la reducción de los hidroperóxidos orgánicos (ROOH) en hidróxidos (ROH) y H₂O a expensas del GSH. De esta manera, la GPx disminuye la toxicidad de los ROOH en el entorno celular.

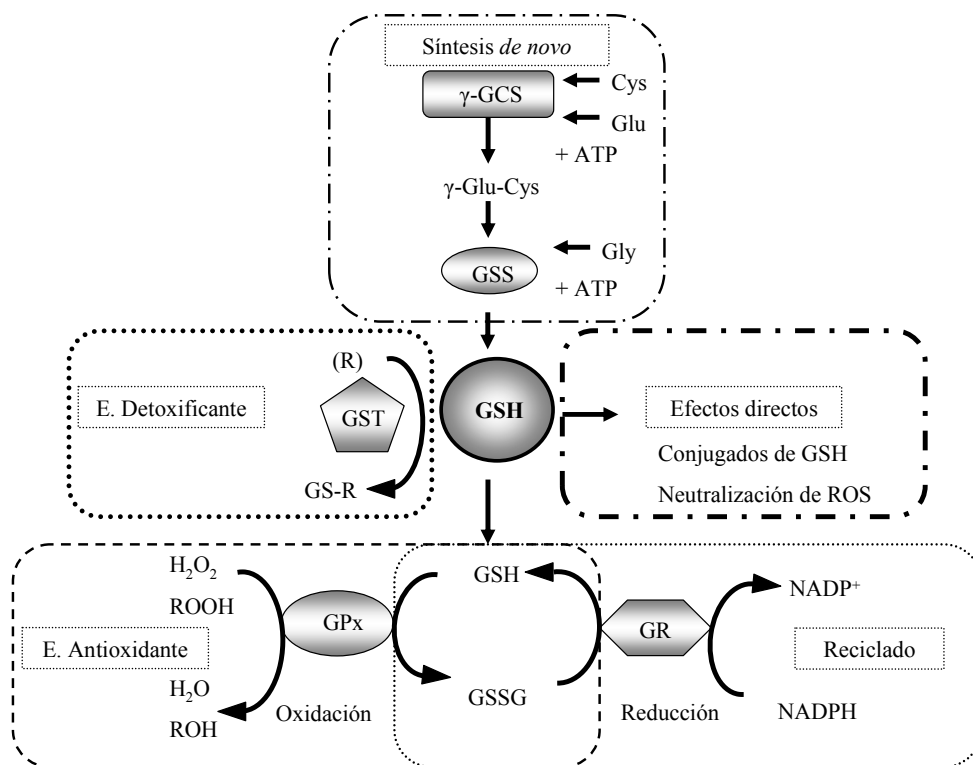


Figura 4.- Esquema de las principales defensas antioxidantes enzimáticas relacionadas con el glutatión. γ -GCS, γ -glutamylcisteína sintetasa; GSS, glutatión sintasa; Cys, L-cisteína; Glu, L-glutámico; Gly, glicina; ATP, adenosina trifosfato; GSH, glutatión reducido; R, compuestos electrophílicos y xenobióticos; GS-R, conjugados de glutatión con xenobióticos; ROOH, hidroperóxidos orgánicos; ROH, hidróxidos; E., efecto; GPx, glutatión peroxidasa; GR, glutatión reductasa; GSSG, glutatión oxidado; $NADP^+$, nicotinamida-adenina-dinucleotido-fosfato oxidada; NADPH, nicotinamida-adenina-dinucleotido-fosfato reducida. (Adaptado de Fujii y colaboradores, 2011⁵⁹).

Existen varias isoformas de la GPx con distinta distribución tisular. Esta enzima puede encontrarse en 2 formas químicas: dependiente e independiente del selenio. Las distintas isoformas de la GPx protegen frente al estrés oxidativo celular en el citosol, en el núcleo, en la mitocondria, unidas a membranas e incluso alguna de las isoformas puede ser secretada en el plasma y en el fluido del epidídimo⁶⁰⁻⁶¹.

La **glutatión reductasa (GR)** es una enzima que ha sido localizada en el citosol y en la mitocondria. Su función consiste en la reducción del glutatión oxidado, generalmente por la GPx, a glutatión reducido, utilizando como cofactor de reducción la nicotinamida-adenina-dinucleotido-fosfato (NADPH). La restauración del contenido del glutatión reducido es vital frente a la protección del estrés oxidativo por dos motivos: recicla el GSSG a GSH aumentando el sustrato de las enzimas detoxificantes dependientes del GSH y evita la toxicidad producida por el acúmulo de GSSG en el interior celular⁵⁹.

La **glutathion S transferasa (GST)** es una de las enzimas principales encargadas de la detoxificación de xenobióticos. La GST cataliza la conjugación de xenobióticos electrofílicos con compuestos ricos en grupos tioles ($-SH$), generalmente GSH⁶². La enzima GST parece ser una respuesta evolutiva de protección frente a la toxicidad y el estrés oxidativo por metabolitos endógenos, pues presenta diversas isoformas inducibles con distintos patrones de distribución tisular⁶². Atendiendo a su localización se clasifican en 3 familias que pueden presentar diversas isoformas: la GST citosólica (α , μ , ω , ζ , σ , π , θ) la mitocondrial (α , μ , π , κ) y la microsomal (que contiene 6 miembros incluyendo las GSTs asociadas a leucotrienos, a la 5-lipoxigenasa y a la prostaglandina E)^{43, 62}.

La **γ -glutamylcisteina sintetasa (γ -GCS)** es la enzima principal en la síntesis *de novo* del GSH. Cataliza el primer paso en la formación del GSH, uniendo los aminoácidos glutamina y cisteína utilizando una molécula de ATP. Posteriormente la **glutathion sintasa (GSS)** incorpora el aminoácido glicina de manera dependiente de ATP completando la formación de la molécula de GSH⁵⁹.

Numerosos estudios han relacionado las alteraciones que se producen en las defensas endógenas del glutathion con una amplia variedad de patologías implicadas en enfermedades inflamatorias y en el cáncer^{57,63-64}.

2.3 Funciones fisiológicas y patológicas de los ROS

En condiciones de homeostasis celular, existe una situación de equilibrio redox entre la generación de los ROS producida por fuentes exógenas y endógenas a la célula y los mecanismos de defensa celular. Aunque los ROS suelen estar implicados en los procesos de daño celular, en el equilibrio redox desempeñan funciones fisiológicas para la célula. De este modo, intervienen en la proliferación, la diferenciación y la apoptosis de la célula a través de pequeños cambios redox en el ambiente celular. Los ROS están implicados en la respuesta inmune, aumentando la activación de linfocitos T y la liberación de interleuquinas. Además, actúan como mecanismo de defensa frente a patógenos siendo liberados por los neutrófilos y los macrófagos durante el proceso inflamatorio. Igualmente, intervienen en la regulación del tono vascular, especialmente en el músculo liso y en la inhibición de las plaquetas de adhesión. Por otro lado, también pueden funcionar como sensores en las situaciones de cambio en el nivel de oxígeno celular^{50,57}.

Muchas de las funciones fisiológicas desempeñadas por los ROS son llevadas a cabo a través de vías de señalización celular sensibles a los cambios temporales en las concentraciones de los ROS^{50,57}. Sin embargo, en condiciones patológicas o de estrés oxidativo, las concentraciones anormales de los ROS producen cambios permanentes sobre dichas vías de señalización celular, contribuyendo al origen de numerosas enfermedades⁵⁰. Numerosos estudios coinciden en que el mecanismo por el que los ROS interaccionan con las proteínas de las vías de señales es a través de la oxidación/modificación en algunos de sus residuos de cisteína⁶⁵⁻⁶⁶. Tanto la fosforilación como la defosforilación son procesos claves en la regulación de la actividad enzimática involucrada en la señalización celular. De esta forma, los ROS pueden producir modificaciones en las rutas de señalización celular a través de su interacción con residuos de cisteína de las proteínas quinasas y fosfatasa que regulan la activación/inhibición de dichas rutas⁶⁵⁻⁶⁶.

2.3.1 Vías de señales implicadas en las enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo

Las especies reactivas del oxígeno modulan diversas vías de señales dentro del equilibrio redox celular. No obstante, en condiciones prolongadas de desequilibrio oxidativo, los ROS pueden activar de forma inadecuada las vías de señales celulares, rompiendo el estado de homeostasis celular y contribuyendo en el inicio de ciertas enfermedades inflamatorias y del cáncer. Entre estas vías de señales sensibles a cambios redox destacan una serie de proteínas serina/treonina quinasas tales como las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), la fosfatidil-inositol-3-quinasa (PI3K) y la proteína quinasa C (PKC)⁶⁷.

2.3.1.1 Proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs)

Las MAPKs son una serie de proteínas que convierten los estímulos extracelulares en una amplia variedad de respuestas intracelulares, activando factores de transcripción específicos en respuesta a dichos estímulos⁶⁸⁻⁷¹. Así, las MAPKs coordinan la regulación de la proliferación, la diferenciación, la adaptación al estrés y la apoptosis⁶⁷. Los ROS están considerados como segundos mensajeros y atendiendo a la intensidad y duración de su señal pueden regular las funciones de las MAPKs⁶⁸.

Las MAPKs están formadas por tres familias que divergen estructuralmente unas de otras: las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERKs), las quinasas c-Jun N-

terminal (JNKs) y las quinasas p38 (p38)^{67,72}. Cada una de estas familias está constituida por tres quinasas que se activan por fosforilación produciendo una cascada de transducción de las señales que finalmente producen una respuesta celular al estímulo recibido. De esta forma, cuando un estímulo externo activa a la primera proteína quinasa (MAPKKK), ésta activa la segunda quinasa (MAPKK) que finalmente activa la quinasa efectora (MAPK), como son las ERKs, JNKs y p38⁷² (Figura 5).

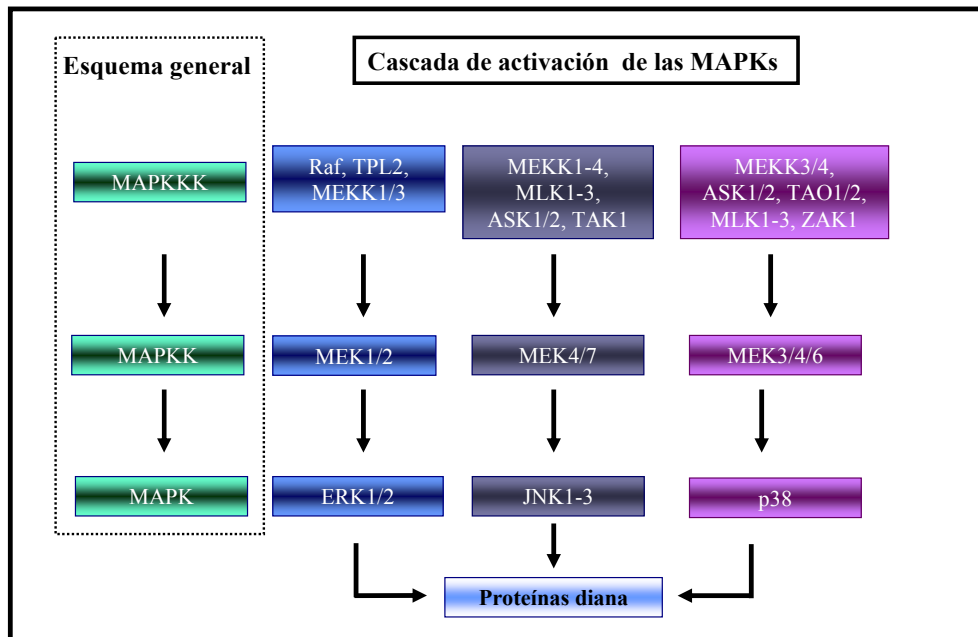


Figura 5.- Esquema general de las cascadas de transducción de señales de las MAPKs. (Adaptado de Coskun y colaboradores, 2011⁷²)

Las ERKs son activadas por factores de crecimiento, por la luz UV o por algunos promotores de tumores. Igualmente, las situaciones de estrés oxidativo producen una activación sustancial de las ERKs⁶⁷. Las ERKs intervienen en diversos procesos como el tráfico endosomal⁷³, la señalización antiapoptótica⁷⁴ y la supervivencia celular⁷⁵. De esta forma, alteraciones en los patrones de activación de las ERKs afectarán directamente a los procesos vitales en las células. En este sentido, numerosos estudios han relacionado las alteraciones en la activación de esta vía con enfermedades inflamatorias^{72,76} y las disfunciones de las proteínas que componen la secuencia de activación de las ERKs con varios tipos de cáncer⁷⁷⁻⁷⁸.

La activación de las vías de señalización de las JNKs y p38 está generalmente relacionada con citoquinas pro-inflamatorias tales como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y la interleuquina-1 β (IL-1 β). También se ha visto que estas vías son

moduladas en respuesta al estrés celular, como el genotóxico, el osmótico, el oxidativo o por la hipoxia⁷⁷. Las JNKs se caracterizan por fosforilar y activar a la proteína c-Jun en su secuencia amino terminal. c-Jun pertenece a una subfamilia de proteínas que junto con Fos constituyen las subunidades principales de la proteína activadora-1 (AP-1). La AP-1 es un factor de transcripción relacionado con la inflamación, la diferenciación, la apoptosis, la migración celular y la cicatrización de heridas⁷⁹. Por su parte, la p38 puede estar implicada en la inflamación de forma directa, a través de la fosforilación de proteínas implicadas en el proceso, o bien de forma indirecta a través de la fosforilación de proteínas que posteriormente activan factores de transcripción, siendo uno de los más importantes el factor de transcripción nuclear kappa B (NF-κB). Asimismo la p38, regula la expresión de genes pro-inflamatorios como la enzima ciclooxygenasa-2 (COX-2)⁸⁰⁻⁸¹. Por tanto, las alteraciones en la expresión y la actividad de las vías de las JNKs y la p38 pueden romper el estado de homeostasis celular a través de un exceso tanto de la apoptosis celular como del proceso de inflamación. De esta manera, una disfunción en estas vías de señales puede estar implicada en la patogénesis de numerosas enfermedades^{72,77}.

2.3.1.2 Vía de la fosfatidil-inositol-3-quinasa y su proteína quinasa AKT (PI3K/AKT)

Los ROS pueden modular la proliferación y el crecimiento celular a través de la activación de la vía de señalización de la PI3K/AKT⁸². La vía de señalización PI3K/AKT promueve la supervivencia y el crecimiento celular a través de múltiples factores de transcripción y de proteínas de señalización⁸³. Estos factores de transcripción disminuyen los niveles de expresión/actividad de diversas proteínas proapoptóticas⁸⁴ e incrementan los niveles de proteínas antiapoptóticas y de supervivencia⁸⁵. Además, la AKT es capaz de activar el ciclo celular a través de la inhibición de varios de sus puntos de control⁸⁵. Por consiguiente, dado que la vía de señalización de la PI3K/AKT está ampliamente implicada en la supervivencia y en la proliferación celular, una activación constitutiva de esta vía suele ser frecuentemente asociada al cáncer⁸³.

2.3.1.3 Proteína quinasa C (PKC)

La PKC es una proteína quinasa que presenta dominios susceptibles de ser estimulados por ROS. La familia de la proteína quinasa C (PKC) presenta una

regulación redox muy compleja pues está constituida por diversas isoenzimas que presentan distintas funciones y patrones de distribución^{50,67}. Por ello, la activación oxidativa de la PKC tiene importantes consecuencias en la funcionalidad de sus proteínas dianas, como las vías de señales de las MAPKs o los factores de transcripción (NF- κ B o AP-1) que juegan un papel crítico en la proliferación del cáncer (revisado en Valko y colaboradores, 2007⁵⁰).

2.3.2 Estrés oxidativo y apoptosis

La apoptosis o muerte celular programada es una función esencial de la vida animal por la cual son eliminadas aquellas células no deseadas por el organismo sin necesidad de una respuesta inflamatoria. No obstante, un defecto en la regulación de la apoptosis puede causar diversas enfermedades. Así, el incremento de la tasa de apoptosis celular contribuye al desarrollo de enfermedades degenerativas o autoinmunes mientras que la falta de respuesta en las señales apoptóticas puede conducir al desarrollo del cáncer⁸⁶.

La apoptosis puede ser ejecutada por dos vías distintas dependientes de caspasas: la vía intrínseca y la vía extrínseca. En ambos casos un estímulo externo activa a una caspasa iniciadora (la caspasa-9 en la vía intrínseca y la caspasa-8 y -10 en la vía extrínseca) que a su vez activa a otra caspasa denominada caspasa efectora (caspasa-3), que es la que desencadena el proceso apoptótico⁸⁷. La regulación de las caspasas es muy precisa y está controlada a su vez por la familia de proteínas denominadas Bcl-2 (gen 2 del linfoma de células B) que actúan como interruptores de vida/muerte celular⁸⁷. De esta manera, la activación del proceso de apoptosis celular depende del equilibrio entre las proteínas de esta familia que actúan como pro-apoptóticas (Bax, Bad, Bcl-x_S) y las que actúan como anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-x_L)⁸⁸ (Figura 6).

Los ROS pueden modular la apoptosis activando o inhibiendo las proteínas caspasas y la familia de las proteínas Bcl-2 a través de la regulación de las MAPKs y de la PKC. Los ROS también pueden regular las proteínas caspasas de forma directa a través de la activación de sus dominios sensibles a modificaciones oxidativas.

De forma general, las señales de supervivencia celular están controladas por las vías de la PI3K/AKT y las ERKs, mientras que las señales de muerte celular por apoptosis están controladas por las JNKs y la p38 MAPK³⁸. En función del estado redox celular prevalecen una de estas vías de señales sobre las otras, determinando el destino hacia la supervivencia o la apoptosis celular³⁸. En este sentido, cuando en la célula dominan las

vías de señales PI3K/AKT y ERKs, prima la supervivencia celular, inhibiéndose las vías de muerte por apoptosis. Sin embargo, en condiciones de estrés oxidativo, los ROS provocan la inactivación de las vías de supervivencia y la activación de las vías de las JNKs y la p38 MAPKs, dando paso al proceso de apoptosis^{38,89}. Igualmente, algunas de las isoformas de la PKC pueden ser estimulada directamente por ROS desencadenando la activación de las JNKs y p38 MAPKs⁸⁹. Por tanto, como consecuencia del aumento de los ROS durante las situaciones de estrés oxidativo puede producirse una respuesta apoptótica excesiva, dando lugar a diversas patologías implicadas en el desarrollo de enfermedades⁵⁵.

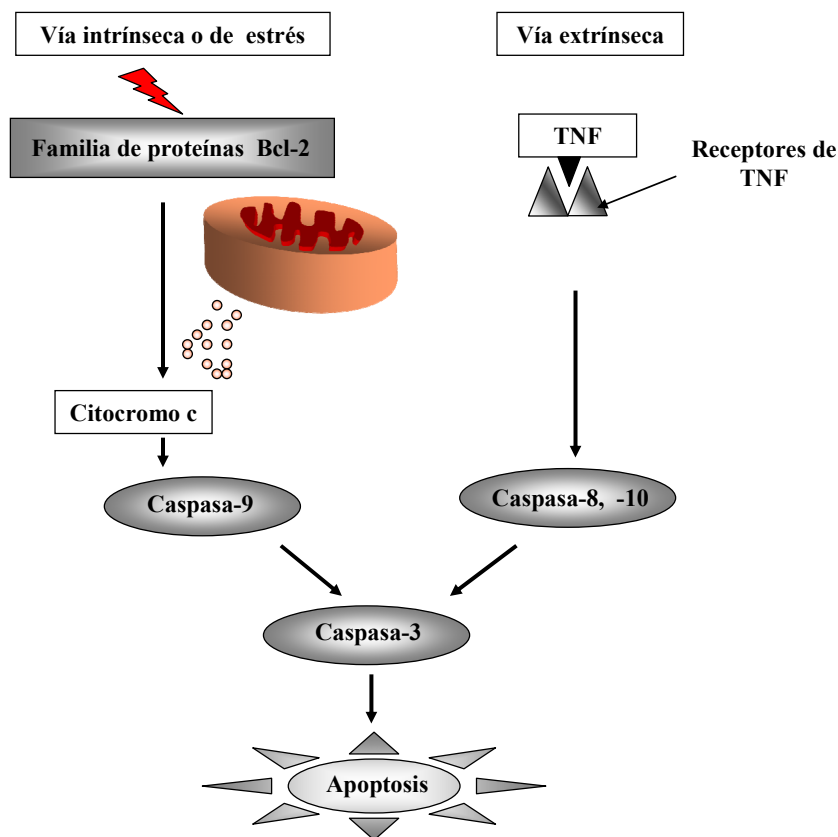


Figura 6.- Vías de activación de la apoptosis. En la vía intrínseca el estrés intracelular puede alterar el equilibrio entre las proteínas de señalización anti- y pro-apoptóticas, liberando el citocromo c y desencadenando la activación de las caspasas iniciadoras y efectoras. En la vía extrínseca la unión del ligando TNF de la superfamilia de muerte a su receptor desencadena también la activación de las caspasas, induciendo finalmente la muerte por apoptosis. Bcl-2, gen 2 del linfoma de células B; ROS, especies reactivas del oxígeno; TNF, factor de necrosis tumoral. (Adaptado de Adams & Cory, 2007⁸⁷)

2.3.3 Factores de transcripción implicados en enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo

La respuesta celular frente al estrés oxidativo depende de la intensidad y del tiempo que permanezca dicho desequilibrio redox. En función de estas dos variables la maquinaria celular puede regular la activación de genes implicados en diversas funciones, con el fin de resolver los desajustes en el equilibrio redox. Existen numerosos factores de transcripción sensibles a cambios en el estado redox que pueden ser modulados en estas circunstancias: NF- κ B, Nrf2, AP-1, FOXO, HIF, MTF1, HSF1, NFAT^{38,50, 67}. De todos ellos se podría destacar al Nrf2 y al NF- κ B.

2.3.3.1 Factor de transcripción relacionado con el factor nuclear eritroide 2p45 (Nrf2)

El Nrf2 es esencial en el mantenimiento de la homeostasis celular, pues protege a las células frente a la carcinogénesis asociada al estrés oxidativo y la inflamación^{68,90}. Este factor de transcripción se induce en respuesta al estrés oxidativo uniéndose a secuencias del ADN, conocidas como elementos de respuesta antioxidante (ARE) o elementos de respuesta electrofílica (EpRE). Estas secuencias codifican para diversas enzimas que directa o indirectamente pueden ejercer funciones antioxidantes y detoxificantes, pueden aumentar la síntesis y la regeneración del glutatión o pueden tener un efecto anti-inflamatorio. Dichas secuencias codifican también para proteínas de reconocimiento, reparación y eliminación de proteínas y nucleótidos dañados así como para receptores, proteínas transportadoras y chaperonas que contribuyen a restablecer la homeostasis celular a través de sus funciones^{65,91}.

En condiciones de homeostasis celular, el Nrf2 se encuentra en el citosol asociado a la proteína represora-1 asociada a ECH (Keap-1). Keap-1 es un homodímero con tres dominios distintos. Uno de estos dominios interactúa con la ligasa de ubiquitina culina-3 (cul3), sirviendo como una plataforma de ubiquitinación y degradación proteosomal para el Nrf2. A través del doble dominio, denominado Kelch, Keap-1 se une a dos regiones del Nrf2, produciendo un plegamiento del Nrf2, que favorece su ubiquitinación y posterior degradación. El tercer dominio de Keap-1 está constituido por residuos de cisteína que actúan como dominio sensor frente al estrés oxidativo o electrofílico^{44,65}.

En condiciones de estrés oxidativo, los residuos de cisteína de Keap-1 son oxidados por los ROS u otras moléculas con carácter electrofílico. La oxidación en los

residuos de cisteína produce un cambio conformacional sobre Keap-1 que impide el ensamblaje de Cul3 y favorece la estabilización y posterior disociación del Nrf2 de su represor. Una vez que el Nrf2 se ha dissociado de su proteína represora, se transloca al núcleo celular donde forma un heterodímero con la proteína Maf. Posteriormente, el heterodímero se une al coactivador de la proteína de unión CREB/p300 (CBP/p300) para iniciar la transcripción de los genes que presentan la secuencia ARE/EpRE^{44,65} (Figura 7).

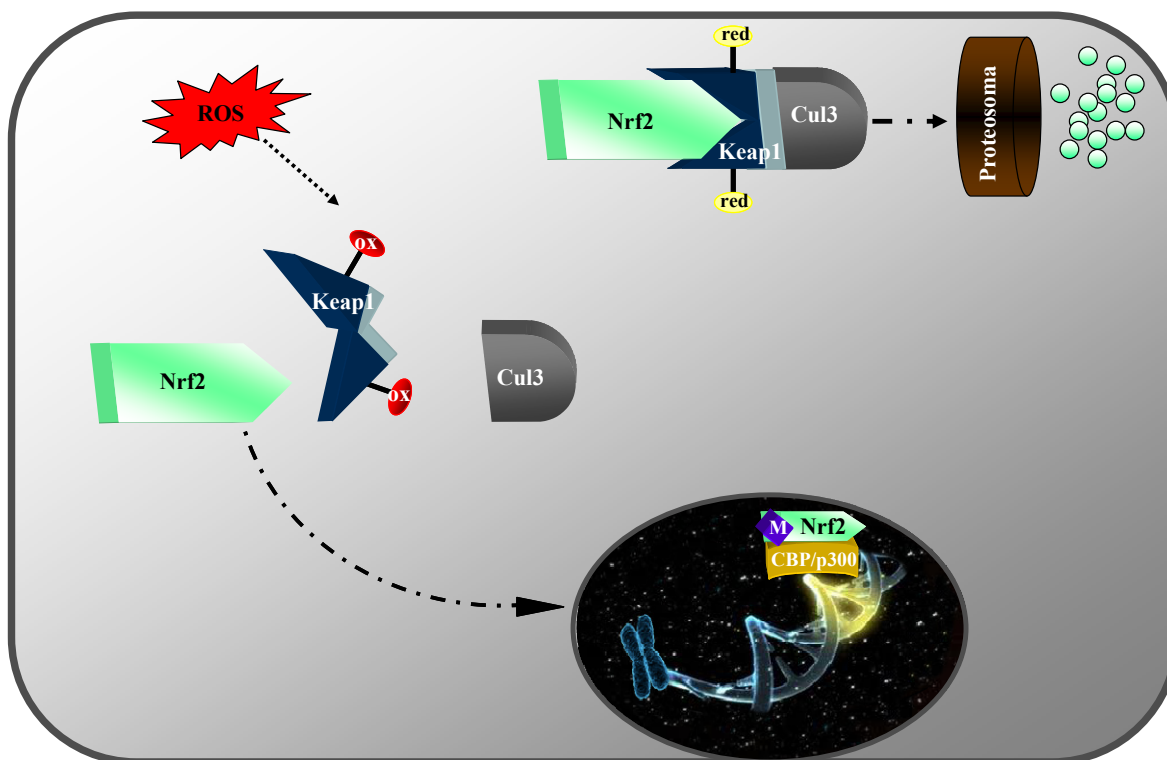


Figura 7.- Regulación redox de la translocación nuclear del Nrf2. ROS, especies reactivas del oxígeno; Nrf2, factor de transcripción relacionado con el factor nuclear eritroide 2p45; Keap1, proteína represora-1 asociada a ECH; Cul3, ligasa de ubiquitina culina-3; red, residuos de cisteína reducidos; ox, residuos de cisteína oxidados; CBP/p300, coactivador de la proteína de unión CREB/p300; M, proteína Maf. (Adaptado de Brigelius-Flohé & Flohé, 2011⁶⁵)

2.3.3.2 Factor nuclear kappa B (NF-κB)

El NF-κB es un factor de transcripción sensible a cambios redox que coordina la respuesta inflamatoria, así como el desarrollo, la proliferación y la supervivencia celular. La familia del factor de transcripción NF-κB está constituida por diferentes complejos proteicos que forman homo- y heterodímeros de cinco proteínas distintas: p65 (RelA), RelB, c-Rel, p50 y p52 y sus respectivos precursores p105 y p100⁹²⁻⁹³.

El NF- κ B en situaciones basales se encuentra inactivo en el citosol unido a una proteína represora, el inhibidor del elemento kappa B (I κ B). Los ROS, a parte de otros estímulos como el TNF α , la IL-1 β , el lipopolisacárido (LPS), las infecciones microbianas, virales y ciertos factores de crecimiento, estimulan la activación del NF- κ B^{38,65}. La activación del heterodímero de NF- κ B (p65/p50) requiere de la disociación de I κ B en el citosol. El proceso de disociación es típicamente producido por la fosforilación de la quinasa del inhibidor del elemento kappa B (IKK), sobre el represor I κ B⁶⁵. En condiciones de estrés oxidativo, la oxidación de residuos de cisteína en las cadenas de dineína de 8 KDa (LC8) asociadas a I κ B, favorece la fosforilación mediada por IKK⁹⁴. Esta situación permite la posterior ubiquitinación del I κ B así como la liberación y translocación del factor de transcripción al núcleo. Una vez en el núcleo el complejo p65/p50 se une a su secuencia promotora junto con el coactivador transcripcional CBP/p300 para llevar a cabo la expresión de genes implicados en la inmunidad innata, la inflamación y la regulación de la supervivencia celular^{65,93} (Figura 8).

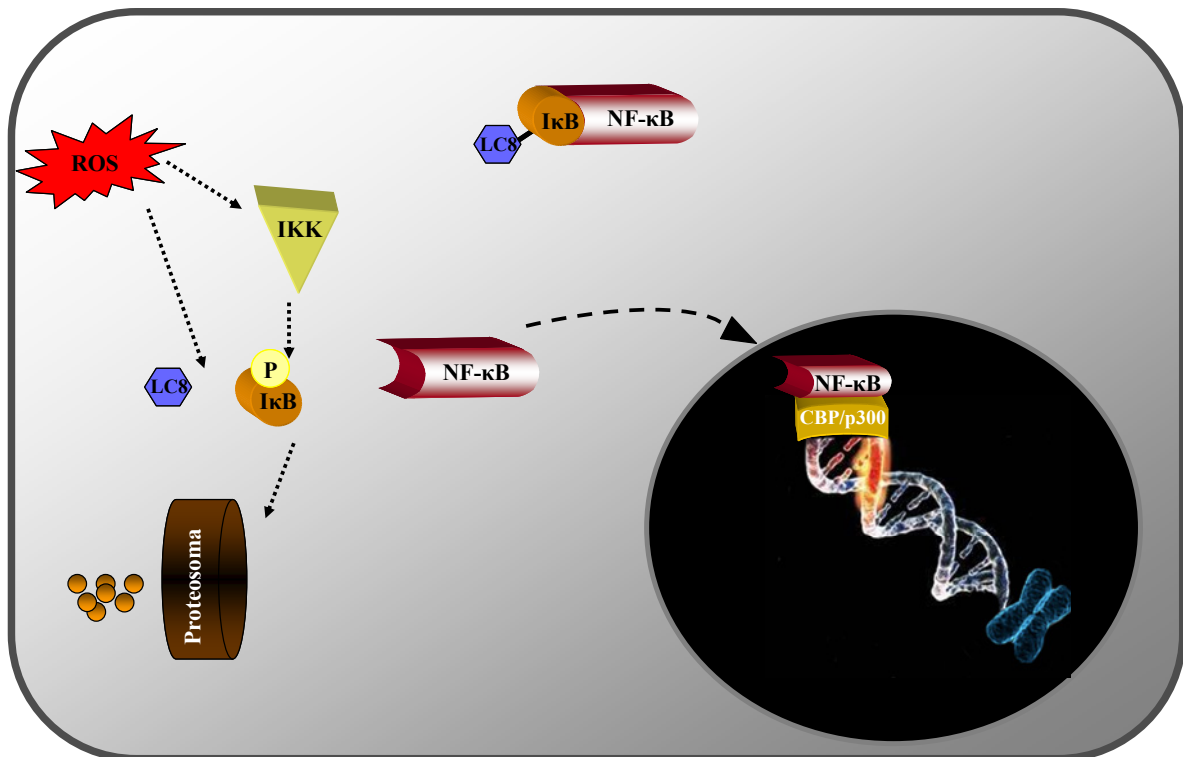


Figura 8.- Regulación redox de la translocación nuclear del NF- κ B. ROS, especies reactivas del oxígeno; NF- κ B, factor nuclear kappa B; IKK, quinasa del inhibidor del elemento kappa B; I κ B, inhibidor del elemento kappa B; LC8, cadenas de dineína de 8 kDa; P, fosforilación; CBP/p300, coactivador de la proteína de unión CREB/p300. (Adaptado de Brigelius-Flohé & Flohé, 2011⁶⁵ y de Trachootham y colaboradores, 2008³⁸)

3. Patologías del tracto intestinal asociadas con el estrés oxidativo y la inflamación

La barrera epitelial intestinal está sometida constantemente al ataque oxidativo que se produce por ciertos compuestos de la dieta, fármacos y de forma endógena por el propio organismo. Los desequilibrios en el estado redox de la mucosa pueden causar consecuencias deletéreas en el intestino por lo que evitarlos resulta esencial para conseguir el correcto mantenimiento de la fluidez del mucus y de la absorción de nutrientes, agua y electrolitos⁵⁷.

Tanto el glutatión como las enzimas relacionadas con él constituyen uno de los mecanismos de defensa antioxidantes principales para controlar el equilibrio redox en la mucosa intestinal⁵⁷. Cada vez existen más estudios que indican que el aumento del estrés oxidativo en la mucosa intestinal⁹⁵ o la disminución en el equilibrio GSH/GSSG^{57,96} están relacionados con el inicio de muchas patologías intestinales. La mayoría de las patologías relacionadas con los desequilibrios del estado redox celular pueden llegar a producir enfermedades inflamatorias y cáncer de colon a través de la activación de vías de señales sensibles a cambios redox y del daño oxidativo a proteínas, lípidos y ADN de la mucosa intestinal⁶³.

3.1 Fisiología e histología del epitelio del colon

La función principal del epitelio intestinal del colon es actuar como una barrera selectiva⁹⁷. Así, permite la absorción de nutrientes de la dieta, electrolitos y agua desde el lumen intestinal hacia el interior celular y evita la entrada de sustancias perjudiciales, incluyendo antígenos extraños, microorganismos y sus toxinas (revisado en Groschwitz & Hogan, 2009⁹⁷).

El epitelio del colon es simple columnar con invaginaciones en forma de dedo que se introducen en el tejido conectivo subyacente de la lámina propia para formar una unidad básica funcional, la cripta (de Lieberkühn)⁹⁸⁻⁹⁹ (Figura 9).

Dentro de la cripta existen cuatro tipos celulares totalmente diferenciados: los colonocitos, las células caliciformes, las células endocrinas secretoras de hormonas peptídicas y las células Paneth que principalmente se localizan en el intestino delgado, pero ocasionalmente también pueden ser encontradas en el colon ascendente y que contienen gránulos eosinófilos⁹⁸⁻⁹⁹. Los colonocitos, las células endocrinas y las células caliciformes se localizan en la parte superior de la cripta y se forman a partir de células madre multipotenciales localizadas en la base de la cripta. Las células madre se van

auto-renovando por divisiones asimétricas que dan lugar a una nueva célula madre y a una célula progenitora. Las células progenitoras, están destinadas a diferenciarse en las células de la pared de la cripta a medida que van migrando hacia la parte superior de la misma. Por otro lado, las células Paneth, cuando están presentes, se diferencian migrando hacia la base de la cripta donde residen situándose por debajo de las células madre⁹⁹⁻¹⁰⁰.

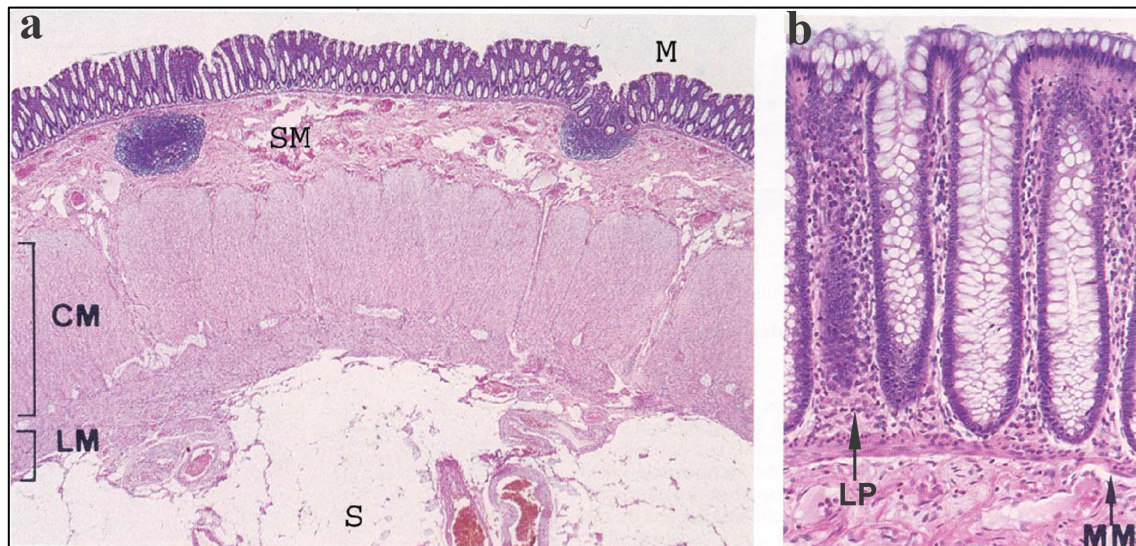


Fig 9.- Histología del colon (adaptado de Wheater, 1987¹⁰¹). a) Representación de las diferentes capas presentes en la pared del colon (tinción hematoxilina-eosina): mucosa (M), integrada por el revestimiento epitelial superficial y que contiene las criptas de Lieberkühn; submucosa (SM) caracterizada por la presencia de vasos sanguíneos y linfáticos; la muscular, formada por una capa circular interna (CM) y una capa longitudinal externa (LM) y por último, la serosa (S). b) Ampliación de la mucosa del colon, donde destacan las criptas de Lieberkühn. Entre la mucosa y la submucosa hay una fina capa de fibras musculares denominada muscular de la mucosa (MM), que puede verse con claridad en la ampliación. Por último las criptas de Lieberkühn se encuentran sostenidas sobre tejido conjuntivo, denominado lámina propia (LP).

Los colonocitos o células de absorción constituyen el 80% del epitelio intestinal. Están altamente polarizados y se caracterizan por la presencia en la superficie apical de microvellosidades que constituyen un borde en cepillo que da al lumen del intestino. Las células epiteliales están conectadas unas a otras a través de distintos tipos de uniones. Esta integridad estructural mantiene una polaridad apical-basolateral y regula el flujo de agua y electrolitos. Una capa de glicoproteínas cubre el borde en cepillo actuando como barrera que limita el paso desde la luz del intestino a proteínas y microorganismos^{57,97}. Las células caliciformes representan del 4-16% del total de las células de las paredes del colon y secretan una barrera protectora de mucus, principalmente constituida por mucina, que protege frente a posibles daños y actúa

como lubricante⁵⁷. Las células endocrinas y las células Paneth constituyen menos del 1% y secretan respectivamente hormonas gastrointestinales (serotonina, sustancia P y secretinas) y lisozimas, defensinas o antimicrobianos que controlan la flora colónica (revisado en Circu & Aw, 2011⁵⁷).

Las células epiteliales del intestino se renuevan cada 3-5 días aproximadamente, constituyendo uno de los tejidos con mayor proliferación del organismo. Este proceso de continua renovación del epitelio está controlado por señales de proliferación y de apoptosis que actúan antagónicamente. Así, la base de la cripta se caracteriza por presentar una activa señalización de proliferación, que estimula la mitosis, la migración y la diferenciación de las células madre (expansión clonal) desde la base de la cripta a la parte superior. De este modo, las células se van diferenciando a medida que van ascendiendo en el eje basal-apical para dar lugar a las células diferenciadas que constituyen la pared de la parte superior de la cripta. La parte superior de la cripta está controlada por señales que inhiben la proliferación y activan la apoptosis de las células favoreciendo el recambio de las células diferenciadas más antiguas que son desechadas al lumen¹⁰² (Figura 10).

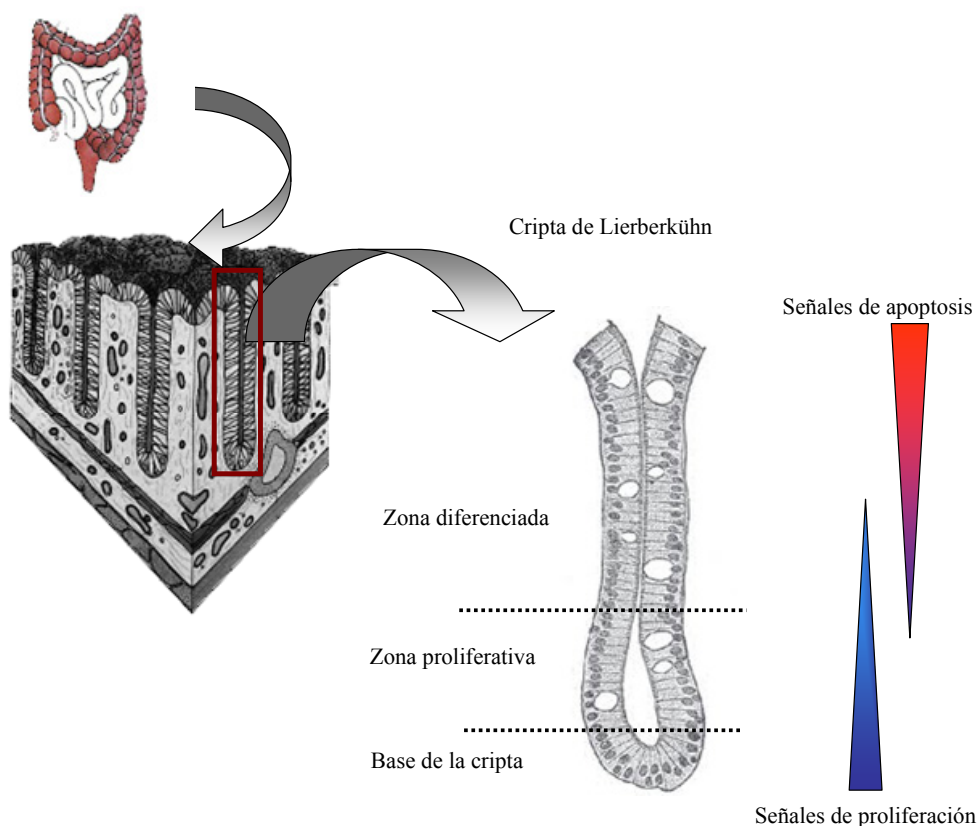


Figura 10.- Efecto antagónico de las señales celulares de proliferación y apoptosis en la cripta del colon. (Adaptado de Vereecke y colaboradores, 2011¹⁰²)

3.1.1 Modelo de estudio del epitelio intestinal *in vitro*: línea celular Caco-2

Se han desarrollado diversos modelos celulares que intentan aproximarse *in vitro* a la complejidad funcional y a la organización morfológica del epitelio intestinal. Entre ellos destacan:

- 1.- Cultivos celulares primarios.
- 2.- Líneas primarias obtenidas de tejidos normales.
- 3.- Líneas celulares establecidas a partir de tumores.

Los cultivos celulares primarios intestinales se obtienen mediante el aislamiento de las células del tejido del intestino delgado o del colon. Sin embargo, como consecuencia de la separación de las células epiteliales del resto de las células que componen el tejido intestinal, se produce una pérdida de la diferenciación celular en función del tiempo. Por esta razón, los cultivos primarios suelen ser utilizados en estudios a corto plazo y no siempre es fácil obtener resultados reproducibles¹⁰³.

Las líneas primarias de tejidos intestinales están formadas por poblaciones de células homogéneas con capacidad de división que pueden crecer y mantenerse durante varios pases celulares. No obstante, estas células se suelen caracterizar por presentar un bajo grado de diferenciación asemejándose más a las células progenitoras de la base de la cripta que a las células maduras que constituyen el epitelio intestinal¹⁰³.

Las líneas celulares obtenidas a partir de tumores constituyen el modelo de cultivo celular más extendido. Esto se debe a varias razones: a) porque pueden mantenerse indefinidamente, b) porque no pierden su grado de diferenciación y c) por la reproducibilidad de los resultados obtenidos¹⁰³.

Existen numerosas líneas celulares obtenidas a partir de tumores humanos y en función del tipo de tumor cada una de ellas presenta un grado distinto de diferenciación celular. La línea celular Caco-2 destaca entre las líneas celulares derivadas de adenocarcinomas gastrointestinales humanos por presentar muchas de las características morfológicas y funcionales de algunas de las células maduras de la mucosa intestinal¹⁰³. Estas células cuando entran en confluencia sufren un proceso de diferenciación espontánea, produciendo la formación de una monocapa de células altamente polarizadas con una membrana apical bien organizada y desarrollada. Además, las propiedades eléctricas, la conductividad iónica y las características de permeabilidad de las células Caco-2 son similares a las de las células de las criptas intestinales (revisado en Sambuy, 2005¹⁰⁴). Por todo ello, han sido ampliamente utilizadas en las últimas

décadas como modelo de barrera intestinal para realizar estudios de absorción intestinal y de toxicidad de xenobióticos¹⁰⁴ (Figura 11).

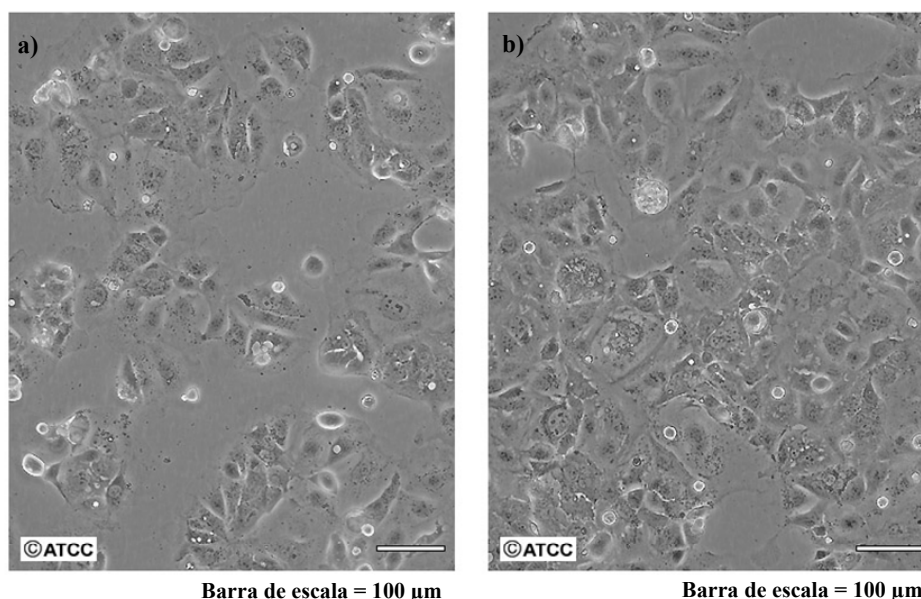


Figura 11.- Imagen obtenida por microscopía óptica de las células Caco-2. a) células Caco-2 en cultivo de baja densidad celular; b) células Caco-2 en cultivo de alta densidad celular. Tomada de ATCC (American Type Culture Collection)

3.2 Alteración del estado redox y patologías intestinales

Numerosos estudios han demostrado que ciertos productos incluidos en la dieta pueden actuar como pro-oxidantes^{57,95}. En este sentido, algunos de los alimentos que se consumen normalmente pueden ser el origen de una fuente exógena de radicales libres en el lumen del tracto intestinal, creando un ambiente oxidativo que puede alterar el equilibrio redox de la mucosa¹⁰⁵⁻¹⁰⁸. Se ha descrito que los desequilibrios en el estado redox de la mucosa constituyen un factor de riesgo en el desarrollo de las patologías intestinales⁵⁷. No obstante, no se conoce con exactitud cómo estos desequilibrios redox comienzan los procesos patológicos. Algunos estudios apuntan a que la disminución del glutatión reducido de la mucosa es un nexo común en el origen y en la progresión de numerosas patologías intestinales⁶³. Igualmente, se ha puesto de manifiesto que una disminución de las defensas antioxidantes/detoxificantes en el epitelio intestinal está relacionada con el desarrollo de ciertos procesos inflamatorios y con el cáncer⁶⁴.

3.2.1 Estrés oxidativo y permeabilidad intestinal

El aumento de la permeabilidad intestinal es una patología muy común asociada a diversas enfermedades inflamatorias intestinales como la enfermedad de Crohn, la enfermedad celiaca, la colitis ulcerosa y las alergias a los alimentos (revisado en Groschwitz & Hogan, 2009⁹⁷). Como consecuencia del aumento de la permeabilidad, se altera la función principal del epitelio intestinal, facilitando la entrada de endotoxinas de la microflora del lumen y afectando la absorción de nutrientes agua y electrolitos^{97,109}. En este sentido, una de las causas que intervienen en el aumento de la permeabilidad intestinal parece ser el incremento de la tasa de apoptosis celular que se produce en la mucosa durante los procesos de inflamación¹⁰².

Los desequilibrios redox producidos por algunos tóxicos alimentarios en la mucosa intestinal disminuyen los niveles del GSH celular y de las defensas antioxidantes, aumentando en consecuencia la generación de los ROS intracelulares⁵⁷. Estos desequilibrios pueden comprometer la integridad de la barrera intestinal tanto directa como indirectamente. Por un lado, el daño directo producido por el exceso de ROS causa la formación de peróxidos lipídicos y de grupos carbonilos que pueden llegar a romper las uniones de las membranas celulares^{63,110}. Por otro lado, los ROS pueden modular las vías de señales sensibles a cambios redox aumentando la tasa de apoptosis^{58,82,111-112}. En concreto, se ha descrito que una activación persistente en las vías de las JNKs y p38 MAPKs está implicada en la activación de los procesos de apoptosis celular^{38,89}. Por tanto, los desequilibrios en el índice GSH/GSSG o la activación de las vías de señales implicadas en la muerte celular por apoptosis durante el desequilibrio redox celular pueden contribuir en el inicio de una patología ampliamente descrita en el proceso inflamatorio, como es el aumento de la permeabilidad intestinal en la mucosa del colon.

3.2.2 Estrés oxidativo y desarrollo del proceso de inflamación intestinal

Numerosos autores han descrito la existencia de un círculo vicioso entre el estrés oxidativo y la inflamación⁸². Así, está ampliamente demostrado que en el proceso inflamatorio se genera una gran cantidad de ROS⁸². Sin embargo, se piensa que el estrés oxidativo también puede contribuir en el origen de los procesos inflamatorios⁶⁴. De este modo, una sobreproducción de ROS generada durante un desequilibrio redox puede causar una disfunción de la barrera epitelial, induciendo un proceso de infiltración de las células inflamatorias en la mucosa intestinal⁶⁴. El exceso de ROS tanto en el origen del

proceso inflamatorio como en las situaciones inflamatorias crónicas puede continuar produciendo daños directos a macromoléculas y modulando las vías de señales sensibles a cambios redox como las MAPKs. En este contexto, diversos estudios han descrito que las vías de las JNKs y la p38 MAPKs están implicadas en el proceso de infiltración de las células inflamatorias en la mucosa intestinal^{72,80,112}. Además, las MAPKs están relacionadas con la activación del factor de transcripción NF- κ B, con la producción de citoquinas pro-inflamatorias y con la inducción de la actividad de enzimas inflamatorias, como la COX-2 y la iNOS^{72,112}. El conjunto de todos estos factores puede ser considerado un importante determinante del daño colónico, que en situaciones prolongadas de activación, contribuyen en el desarrollo y la progresión del proceso inflamatorio^{80,113}.

3.2.3 Estrés oxidativo e iniciación de la carcinogénesis colónica

El estrés oxidativo produce mutaciones en el ADN, siendo éstas una de las causas más frecuentes del proceso de iniciación de la carcinogénesis^{50,82}. En función del nivel de estrés oxidativo y del tiempo de exposición así como del estado de las defensas antioxidantes y de los mecanismos de reparación del daño oxidativo, las células presentan efectos distintos: incrementos de la proliferación, paradas del ciclo celular, senescencia, apoptosis o necrosis¹¹⁴. Mientras que (como se ha visto anteriormente) un nivel elevado de estrés oxidativo puede conducir a la apoptosis celular, niveles “moderados” (que dependen del tipo celular) de estrés oxidativo pueden producir mutaciones celulares^{50,114}. De forma general, las mutaciones son corregidas por los mecanismos de reparación del ADN; pero si alguna de estas mutaciones persiste, dará lugar a una célula iniciada, que podrá transmitir dicha mutación a sus células hijas⁹⁸.

En condiciones fisiológicas, la mucosa colónica es renovada constantemente. Por esta razón, sólo aquellas mutaciones que se producen en las células madre podrán iniciar el proceso carcinogénico⁹⁸. Una célula iniciada puede llegar a propagarse por toda la cripta cuando la mutación le confiere una ventaja selectiva, como es la activación persistente en las señales de supervivencia (vía AKT y NF- κ B) y la inhibición de las señales de muerte celular por apoptosis (JNKs y p38)^{38,82}. En este sentido, el NF- κ B es considerado el elemento molecular principal que relaciona la inflamación crónica con la carcinogénesis¹¹⁵⁻¹¹⁶.

A través del proceso de fisión de cripta, la célula que ha adquirido la mutación puede extenderse a otras criptas, originando un microadenoma^{98,117} o foco de criptas

aberrantes displásicos (ACF, del inglés *aberrant crypt foci*)¹¹⁸⁻¹¹⁹. Los focos de criptas aberrantes displásicos son agrupaciones microscópicas de un pequeño número de criptas anormales y son considerados el estadio detectable más temprano en la formación del proceso de progresión de cáncer colorrectal^{98,118} (Figura 12)

Uno de los genes implicados en la formación de los ACF es la mutación en el gen *APC* (*adenomatous polyposis coli*)¹²⁰. Este gen codifica para una proteína que reprime la proliferación celular en la cripta, de forma que alteraciones o pérdidas de su función producen la proliferación anormal en la cripta desarrollando la transición de células neoplásicas a ACFs¹²⁰. Finalmente, la transformación de la secuencia ACF-adenoma-carcinoma se puede ver favorecida por la acumulación de mutaciones oncogénicas inducidas por el estrés oxidativo en otros genes tales como *K-ras*, *Smad4* o *p53* y sus respectivas cascadas efectoras¹²⁰.

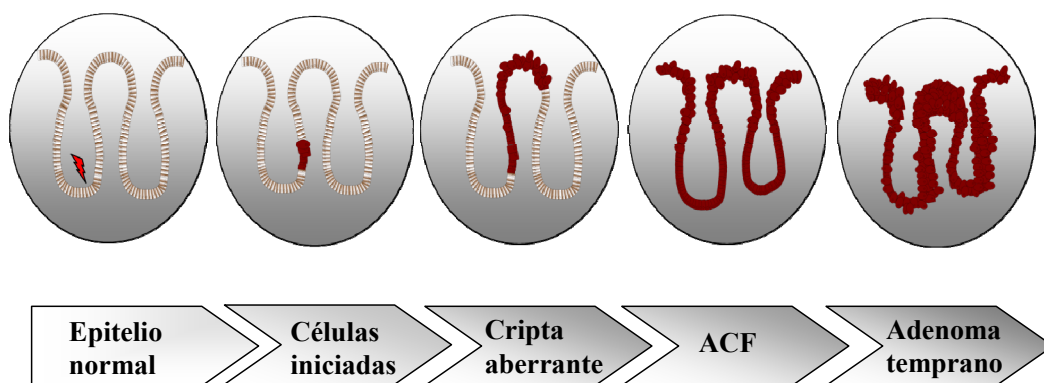


Figura 12.- Secuencia de formación de los ACF. (Adaptado de Pan y colaboradores, 2011¹²⁰ y de Humphries & Wright, 2008⁹⁸).

3.3 Modelo de daño pre-neoplásico inducido en animales de experimentación

Los ACF han sido identificados tanto en humanos como en animales de experimentación y representan las primeras lesiones pre-neoplásicas detectables en el cáncer colorrectal¹²¹. Los ACF son usados como biomarcadores de detección de la fase de iniciación del cáncer colorrectal, pues son fácilmente distinguibles del resto de las criptas normales que conforman el tejido de la mucosa del colon. Además, su progresión se puede identificar por el tamaño, grado de displasia, multiplicidad de cripta y por la combinación de la displasia con la multiplicidad de cripta¹²².

Desde hace dos décadas, se utilizan potentes carcinógenos específicos de colon como el 1,2-dimetilhidracina (DMH) y su metabolito, el azoximetano (AOM) para inducir la formación de ACF en los roedores¹²²⁻¹²³. Las lesiones pre-neoplásicas producidas por estos carcinógenos comparten muchas características histopatológicas con los tumores humanos¹²⁴⁻¹²⁵. Este hecho ha permitido utilizar este modelo en estudios de toxicidad y control/prevención del cáncer. De esta manera, se ha estudiado el efecto quimiopreventivo de numerosos fitoquímicos de la dieta en relación con su capacidad para suprimir o disminuir la formación de los ACF¹²².

En este tipo de experimentos, el carcinógeno suele ser administrado mediante inyección intraperitoneal. Cuando el carcinógeno es metabolizado en el hígado produce un compuesto genotóxico y cancerígeno, el metiazoximetanol. Este último es muy inestable y genera a su vez con gran facilidad un subproducto de alta reactividad electrofílica, el ion metildiazonio, que induce estrés oxidativo en el hígado y en el colon¹²⁶. Como consecuencia del metabolismo del AOM se produce una gran cantidad de mutaciones en el ADN que dan paso a la aparición de los ACF en el colon de los roedores^{122,126}.

En el modelo del AOM se suelen utilizar ratas de la cepa F344, Sprague-Dawley o Wistar de aproximadamente 5-6 semanas de vida. Los animales son tratados con una o dos dosis del tóxico con una cantidad de entre 5-30 mg/Kg de peso del animal^{122,127-128}. Cuando se pretende determinar la eficacia de prevención de una dieta frente a la aparición y desarrollo de los ACF, las inyecciones son practicadas al mismo tiempo o después de comenzar a alimentar a los animales con la dieta objeto de estudio. De manera que si se inyecta más de una dosis se administran durante semanas consecutivas¹²².

La severidad de las lesiones pre-neoplásicas va aumentando en función del tiempo que se prolongue el tratamiento con el AOM, así como de la dosis administrada; aunque también influyen otros factores como el sexo, la edad y la especie del animal¹²². De forma general, entre las 2 y las 8 semanas después de la última inyección, una parte de las células epiteliales del colon comienzan a entrar en fase de iniciación observándose una enorme población de ACF (que presentan de 1-3 criptas por foco)¹²². En las semanas siguientes, en torno a las 12 semanas después de la última inyección, las criptas aberrantes continúan creciendo clonalmente y expandiéndose hacia morfologías que permiten clasificar a los ACF como intermedias con entre 4-6 criptas dentro de los focos. En este momento la morfología de los ACF se clasifica en la fase de

promoción¹²². Finalmente, a partir de las veinticuatro semanas después de la última inyección, la incidencia del carcinógeno alcanza el máximo encontrándose las lesiones avanzadas, correspondientes al estado de progresión del cáncer colorrectal¹²².

4. Efectos saludables del cacao

Actualmente los compuestos fenólicos del cacao han suscitado un gran interés por su potencial capacidad para actuar como eficaces agentes quimiopreventivos. Como antioxidantes, los flavonoides del cacao han demostrado proteger los componentes celulares, disminuyendo el riesgo de padecer cáncer y otras enfermedades¹²⁹⁻¹³⁰. Estos compuestos fenólicos pueden presentar otras propiedades quimiopreventivas además de las antioxidantes¹³¹. Así, estudios recientes *in vitro* han demostrado que estos compuestos pueden modular numerosas vías de señales sensibles a cambios redox¹³². Comparado con otros alimentos, los flavonoides del cacao contienen una alta concentración de procianidinas que son poco absorbidas en el intestino. En consecuencia, estos efectos beneficiosos del cacao podrían ser localmente más importantes en el colon que en otros órganos.

4.1 Polifenoles del cacao

El cacao y sus derivados como el chocolate son comúnmente consumidos en numerosos países y culturas de todo el mundo. Numerosos estudios epidemiológicos han explorado los efectos beneficiosos de alimentos ricos en polifenoles, como el té verde, la soja, o el vino, mientras que los estudios sobre el cacao y el chocolate son todavía escasos¹³³. Sin embargo, el cacao tiene el mayor contenido de flavanoles de todos los alimentos y su ingesta puede llegar a constituir una contribución importante del total de flavonoides tomados con la dieta¹⁰. En la composición fenólica del cacao se distinguen tres grupos principales de flavonoides: las catequinas o flavan-3-oles, que constituyen el 37 %, las antocianinas, que representan el 4 % y las procianidinas que forman el 58 % restante de los flavonoides. Dentro de estos tres grupos, los compuestos fenólicos más abundantes en el cacao son la (-)-epicatequina y sus dímeros, la procianidina B1 y la procianidina B2¹³⁴.

La absorción y el metabolismo de estos compuestos están determinados en gran parte por sus estructuras, conjugación con otros fenoles, tamaño molecular y solubilidad. Diversos estudios han puesto de manifiesto que los flavanoles y las procianidinas permanecen estables durante su tránsito por el tracto gastrointestinal¹³⁵⁻¹³⁶.

Entre estos compuestos fenólicos, las procianidinas parecen ser de 10 a 100 veces menos absorbidas que los constituyentes monoméricos¹³⁶. De esta manera, los dímeros de procianidina son absorbidos a muy baja eficiencia en el intestino delgado, por debajo del 0,5% respecto a sus monómeros de epicatequina y catequina (cuyos niveles de absorción están en torno 22-55%). Por tanto, una gran fracción de las procianidinas del cacao llegan inalteradas al intestino grueso, donde pueden participar en numerosas acciones biológicas⁹³.

4.2 Efectos biológicos del cacao

Los mecanismos de acción implicados en algunos de los efectos saludables producidos por el cacao, parecen estar relacionados con su potente actividad antioxidante y con su capacidad de modular las vías de señales celulares. Como consecuencia de dicha modulación en las vías de señales, los flavanoles del cacao pueden modificar algunas de las funciones celulares para producir así sus efectos en la salud^{129,133,137-138}.

4.2.1 Efectos del cacao sobre el sistema cardiovascular

Los estudios desarrollados sobre el sistema cardiovascular incluyen ensayos *in vitro*, preclínicos y clínicos. Se ha descrito que los flavanoles del cacao están implicados en la reducción del riesgo cardiovascular a través de la inhibición de la activación y de la agregación plaquetaria y de la mejora en el estado antioxidante; disminuyendo biomarcadores de estrés oxidativo como las especies reactivas del ácido tiobarbitúrico y la oxidación de las LDL¹³⁹.

El óxido nítrico (NO) ha sido el objetivo central de numerosos estudios relacionados con el sistema cardiovascular¹³⁹. Se ha mostrado que los compuestos fenólicos del cacao, y especialmente su grupo más abundante, los flavanoles, pueden reducir la producción del anión superóxido e incrementar la producción del óxido nítrico^{129,140}. Ambos efectos han demostrado contribuir significativamente en el aumento de la vasodilatación y por tanto en la disminución de la hipertensión y de la presión arterial¹²⁹. De entre todos los estudios, uno de los más interesantes desde este punto de vista es el de la tribu de los indios *Kuna* en el que se comprobó el efecto de los polifenoles del cacao sobre dichos parámetros cardiovasculares. Los *kuna* beben considerables cantidades de cacao cada día y probablemente son la comunidad que toman las mayores cantidades de cacao en todo el mundo¹⁴¹. De esta forma, se observó

que la dieta rica en cacao disminuía la presión arterial en los individuos de la población de esta tribu aislada. Pero cuando estos individuos emigraban a poblaciones urbanas, modificando su dieta, sus parámetros cardiovasculares se veían aumentados¹⁴¹.

4.2.2 Efectos del cacao sobre la carcinogénesis

Diversos estudios han puesto de manifiesto que extractos polifenólicos obtenidos a partir del cacao son capaces de inhibir la transformación neoplásica inducida por diversos mitógenos a través del bloqueo en la actividad quinasa de la MAPK/ERK1 (*MAPK/ERK Kinase*, MEK1) proteína activadora de la vías de las ERKs en células epiteliales de hígado de rata (RLE) y en la línea celular de queratinocitos de ratón (JB6⁺P)¹⁴²⁻¹⁴⁴.

La epicatequina también se relaciona con la modulación de vías de señales y factores de transcripción sensibles a cambios redox. Así, se ha descrito que este monómero mayoritario en el cacao activa señales de supervivencia celular en las células de hígado HepG2 a través de la modulación de las vías ERKs y PI3K/AKT y de los factores de transcripción Nrf2 y NF-κB¹⁴⁵.

En experimentos *in vivo* se ha comprobado que una dieta rica en cacao atenúa parcialmente el daño hepático inducido por el carcinógeno dietil-N-nitrosamina (DEN) en ratas de experimentación, a través de la modulación de las enzimas antioxidantes y de proteínas clave implicadas en la cascada de señalización celular asociadas a la muerte celular¹³⁸.

Por último, existen evidencias epidemiológicas que apoyan el efecto protector del cacao frente al cáncer y el aumento de la mortalidad en general. Estas evidencias se centran principalmente en dos mecanismos de acción relacionados con los flavonoides del cacao, los efectos antioxidantes y los antiinflamatorios¹³³.

4.2.3 Efectos del cacao sobre la respuesta inmune

Existen ensayos tanto *in vitro* como *in vivo* que muestran que los polifenoles del cacao son capaces de modular la respuesta inmunológica. *In vitro*, se ha visto que el cacao disminuye tanto la activación de macrófagos como la de linfocitos y por tanto la secreción de sus mediadores inflamatorios¹³⁷. *In vivo*, existen pocos estudios, aunque se ha observado que una alta ingesta de cacao modula la respuesta de la función inmune celular e intestinal¹³⁷.

4.2.4 Efectos neuroprotectores del cacao

Se ha descrito que un extracto polifenólico obtenido a partir del cacao y la procianidina B2 protegen a las células neuronales PC12 contra la apoptosis inducida por HNE, a través del bloqueo de la vía de las JNKs y de la activación de la caspasa-3, así como evitando la acumulación de ROS¹⁴⁶. Por otro lado, los estudios realizados por Ramiro-Puig y colaboradores¹⁴⁷ confirman que los flavonoides del cacao pueden ejercer efectos neuroprotectores en modelos celulares a través de la modulación de las MAPKs.

4.3 Efectos de los flavanoles del cacao en el epitelio del colon

El cacao es una fuente de flavanoles monoméricos y procianidinas con carácter antioxidante. Las procianidinas permanecen inalteradas en el tracto gastrointestinal y son absorbidas a muy baja eficiencia en el intestino. Por lo tanto, pueden encontrarse en concentraciones elevadas en el colon, desarrollando numerosos efectos beneficiosos⁹³. En este sentido, los compuestos fenólicos del cacao pueden actuar en el epitelio de la mucosa colónica neutralizando directamente a los ROS. Pero también pueden actuar modulando la señalización celular, a través de la interacción con la membrana y/o con las proteínas de señalización celular⁹³.

La neutralización directa de los ROS, está limitada solo a tejidos/órganos en los cuales exista una concentración relativamente alta de polifenoles, siendo por tanto el colon, uno de los pocos órganos diana posibles⁹³. No obstante, resultan mucho más interesantes los efectos saludables que los flavanoles del cacao pueden ejercer en el colon por interacción con las membranas celulares y con las proteínas implicadas en señalización celular.

En las células intestinales Caco-2, las interacciones de procianidinas hexaméricas con la membrana celular han sido asociadas como un mecanismo de acción citoprotector, antioxidante y antiinflamatorio. Así, se ha visto que estos flavonoides interactúan con la membrana celular protegiendo a las células frente a los daños inducidos por los ácidos biliares¹⁴⁸. Además, las procianidinas interaccionan con el receptor de TNF α impidiendo la unión de su ligando específico (TNF α) e inhibiendo de este modo la activación del NF- κ B¹⁴⁹. Por otro lado, se ha demostrado que los extractos polifenólicos del cacao tienen efectos antiproliferativos en las células intestinales Caco-2 a través de la inhibición de la ruta de biosíntesis de poliaminas, implicada en la proliferación celular y en el cáncer¹⁵⁰.

En las células epiteliales intestinales humanas T-84, los flavanoles del cacao actúan como inhibidores de los canales reguladores de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística¹⁵¹ (del inglés *Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator*, CFTR). Éstos son los canales principales de Cl⁻ en la membrana apical del epitelio de las criptas colónicas y son esenciales en la absorción gastrointestinal y en la secreción de sales y agua. Una difusión excesiva de agua y electrolitos a través de estos canales constituye una de las bases de la diarrea. Por tanto, la interacción de los flavanoles con los canales de membrana CFTR, contribuye, al menos *in vitro*, a paliar la severidad de ciertas enfermedades intestinales¹⁵¹.

Las interacciones de membrana con los compuestos fenólicos de la dieta pueden modular numerosas vías de señales intracelulares¹⁵². De esta manera, los polifenoles pueden ejercer efectos protectores frente al estrés oxidativo y las enfermedades relacionadas con los desequilibrios oxidativos modulando la expresión génica celular. Entre estas vías de señales se encuentran las MAPKs, la PI3K/AKT, las señales de apoptosis y los factores de transcripción NF-κB y Nrf2¹⁵²⁻¹⁵⁴. En este sentido, se han realizado pocos estudios que expliquen como los polifenoles del cacao modulan las vías de señales intracelulares para ejercer sus efectos beneficiosos en la mucosa intestinal. Noe y colaboradores, 2004¹⁵⁵ realizaron un estudio sobre el efecto de los polifenoles del cacao en el perfil de expresión genético en las células humanas Caco-2. Así, demostraron que los polifenoles del cacao pueden alterar la expresión de los genes implicados en la respuesta celular al estrés oxidativo. Además, en un estudio llevado a cabo *in vivo* en ratones de la cepa Balb/C se ha demostrado que la administración oral de extractos enriquecidos en polifenoles del cacao atenúa la colitis ulcerosa inducida por el tóxico dextrano sulfato sódico (DSS)⁴¹. Esta enfermedad inflamatoria intestinal fue atenuada a través de una disminución en varios de los factores de transcripción implicados en el proceso⁴¹. Por tanto, estos experimentos ponen de manifiesto la importancia de los fenoles del cacao en la modulación de la expresión génica a través de la regulación de vías de señales celulares y de factores de transcripción en la mucosa intestinal del colon.

Objetivos generales

El estrés oxidativo parece ser una de las causas implicadas en el origen de numerosas patologías y enfermedades intestinales. Los desequilibrios redox producidos en la mucosa intestinal pueden dar lugar a daños oxidativos y a una disfunción en las vías de señalización celular iniciando diversos procesos patológicos.

En los últimos años la prevención nutricional de las enfermedades ha empezado a tomar una gran importancia. Así, ha surgido un gran interés por investigar los efectos biológicos de los compuestos bioactivos de los alimentos de la dieta frente al inicio y el desarrollo de diversas enfermedades. En concreto, se ha descrito que ciertos flavonoides pueden proteger frente al estrés oxidativo. Este efecto protector no solo se debe a su alta capacidad antioxidante, sino que además, los flavonoides pueden modular las vías de señales promoviendo toda una serie de efectos beneficiosos en las células que repercuten en los distintos órganos y en todo el organismo.

El cacao y sus derivados como el chocolate son comúnmente consumidos en numerosos países y culturas de todo el mundo. Este producto, supone una importante fuente de procianidinas, un tipo de flavonoides de alto peso molecular y de limitada absorción intestinal. Sin embargo, a pesar de sus propiedades y de su amplia aceptación, hasta el momento son pocos los estudios que se han centrado en investigar los efectos de los flavonoides del cacao en el epitelio de la mucosa intestinal. De acuerdo con ello, este estudio se ha centrado en evaluar los mecanismos moleculares a través de los cuales los flavonoides del cacao pueden proteger frente al estrés oxidativo implicado en el inicio de las patologías intestinales. Con este fin, se han planteado los siguientes objetivos:

1.- Evaluar la efectividad de los flavonoides mayoritarios del cacao en la protección intestinal, utilizando dosis fisiológicas en un modelo de estrés oxidativo en las células intestinales de colon Caco-2.

2.- Estudiar los mecanismos moleculares de protección de los flavonoides del cacao frente al estrés oxidativo inducido por un tóxico alimentario en células intestinales Caco-2.

3.- Estudiar el potencial efecto protector de una dieta enriquecida en cacao frente al inicio del cáncer de colon en un modelo animal *in vivo*.

Resultados

Capítulo 1

Evaluación de la efectividad de los flavonoides mayoritarios del cacao en la protección intestinal en un modelo de estrés oxidativo en las células intestinales de colon Caco-2

Resumen

Los flavanoles son una importante fuente de antioxidantes presentes en alimentos y en bebidas como el cacao, el vino y el té¹. Se ha descrito que estos compuestos bioactivos protegen frente al estrés oxidativo y reducen el riesgo de padecer diversas enfermedades⁵. En este trabajo se seleccionaron los flavanoles más representativos de algunos de estos alimentos para evaluar su respuesta antioxidante a dosis fisiológicas en las células intestinales. Así, se estudió el efecto directo de cuatro flavanoles, la epicatequina (EC), la epicatequina-3-galato (ECG), la epigallocatequina-3-galato (EGCG) y la procianidina B2 (PB2) sobre la viabilidad y la proliferación en la línea celular Caco-2. De la misma manera, se estudió el efecto de los compuestos bioactivos sobre los marcadores del estado redox celular y la actividad de las defensas enzimáticas antioxidantes/detoxificantes (GPx, GR y GST). Finalmente, se comprobó el efecto protector de estos compuestos frente al estrés oxidativo producido por un agente pro-oxidante, el *tert*-butil-hidroperóxido (*t*-BOOH).

El tratamiento con los flavanoles no afectó a la viabilidad celular ni a la proliferación. Tampoco modificó los niveles del GSH aunque sí disminuyó la generación de los ROS intracelulares. La ECG aumentó la actividad de la enzima GPx, mientras que la PB2 incrementó la actividad de las tres enzimas evaluadas (GPx, GR y GST) de manera dosis-dependiente. El pre-tratamiento con los flavanoles durante 20 horas disminuyó el estrés oxidativo y la apoptosis inducidos por el *t*-BOOH, a través de la reducción de la generación de ROS y del bloqueo en la activación de la caspasa-3.

En conclusión, el estudio *in vitro* ha demostrado que los flavanoles utilizados protegen frente al estrés oxidativo y la muerte celular inducidos por un agente pro-oxidante a través de la reducción de los ROS y de la activación de la caspasa-3. La procianidina B2, presente en el cacao mostró un efecto superior al de los otros flavanoles estudiados, protegiendo a las células Caco-2 al menos por dos mecanismos distintos: a través de su capacidad de captar y neutralizar ROS y aumentando la actividad de las defensas endógenas antioxidantes.

Artículo 1

Comparative effects of dietary flavanols on antioxidant defences and their
response to oxidant-induced stress on Caco2 cells

Ildefonso Rodríguez-Ramiro · María Ángeles Martín · Sonia Ramos · Laura Bravo ·
Luis Goya

European Journal of Nutrition (2011)

DOI: 10.1007/s00394-010-0139-2

Comparative effects of dietary flavanols on antioxidant defences and their response to oxidant-induced stress on Caco2 cells

Ildefonso Rodríguez-Ramiro · María Ángeles Martín ·
 Sonia Ramos · Laura Bravo · Luis Goya

Received: 7 May 2010 / Accepted: 15 October 2010 / Published online: 3 November 2010
 © Springer-Verlag 2010

Abstract

Purpose Flavanols are an important fraction of our diet both for their antioxidant capacity and because they are constituents of greatly accepted foodstuffs such as tea, wine and cocoa. In addition to their antioxidant activity by directly scavenging intracellular reactive oxygen species (ROS), flavanols have been recently shown to enhance protective enzymes. The objective was to evaluate the antioxidant response of colon-derived Caco2 cells to dietary flavanols.

Methods Four representative flavanols were selected: epicatechin (EC), epicatechin-3-gallate (ECG), epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and procyanidin B2 (PB2). Cell viability, concentration of ROS and reduced glutathione (GSH), and activity of antioxidant/detoxification enzymes and caspase 3 were determined.

Results Treatment of Caco2 cells with flavanols decreased ROS production but did not affect GSH content. ECG induced glutathione peroxidase (GPx), whereas PB2 evoked a dose-dependent increase in GPx, glutathione reductase and glutathione-S-transferase. Enhancement of the antioxidant defences implies an improved cell response to an oxidative challenge. Hence, Caco2 cells treated 20 h with the flavanols, especially PB2, and then submitted to an oxidative stress induced by a pro-oxidant, *tert*-butylhydroperoxide, showed a reduced ROS production,

restricted activation of caspase 3 and higher viability than cells plainly submitted to the stressor.

Conclusions Flavanols protect Caco2 cells against an induced oxidative stress and subsequent cellular death by reducing ROS production and preventing caspase-3 activation. In particular, PB2 increases the activity of antioxidant/detoxification enzymes and thus protects Caco2 cells by directly counteracting free radicals and also by activating the antioxidant defence system.

Keywords Epicatechin · Epicatechin gallate · Epigallocatechin-3-gallate · Procyanidin B2 · Oxidative stress · Flavonoids

Introduction

Oxidative stress and reactive oxygen species (ROS)-mediated cell damage have been implicated in the development of various human chronic pathologies such as cardiovascular disease, certain cancers and a number of neurodegenerative diseases [1]. In particular, dietary pro-oxidants may alter the redox status of intestinal cells and provoke gastrointestinal pathologies such as inflammatory bowel disease and colon cancer. Epidemiological studies have related a diet rich in fruits and vegetables to the prevention of chronic degenerative diseases linked to oxidative stress [2]. Supporting this, the antioxidant and chemoprotective properties of individual food flavonoids or polyphenolic extracts have been widely reported in cultured cells [2], animal models [3] and humans [4, 5]. In line with these studies, we have recently shown that a polyphenolic extract from cocoa composed mostly of flavanols such as epicatechin (EC), catechin and dimeric procyanidins has the ability to protect human liver cells against oxidative stress [6].

Both Ildefonso Rodríguez-Ramiro and María Ángeles Martín should be considered as first authors of the article.

I. Rodríguez-Ramiro · M. Á. Martín · S. Ramos · L. Bravo ·
 L. Goya (✉)
 Department of Metabolism and Nutrition,
 Instituto del Frío-ICTAN, CSIC, José Antonio Novais 10,
 Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain
 e-mail: luisgoya@if.csic.es

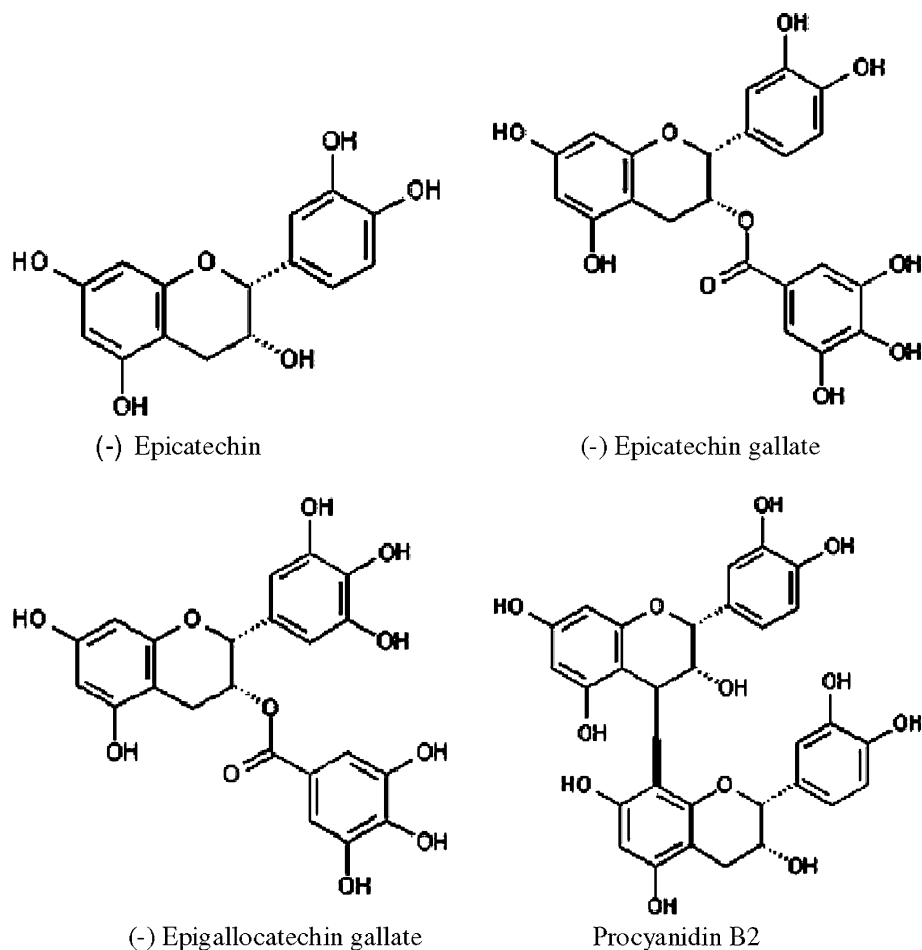
Furthermore, in another study with liver-derived cells, we have reported that EC alone was able to prevent most of the damage induced by a strong pro-oxidant [7].

Many of the biological actions of dietary flavonoids have been generally related to their free radical scavenging and antioxidant capacity, but emerging findings indicate that natural compounds may also act increasing the endogenous antioxidant defence potential [8]. Several studies have shown that flavonoids such as EC [7], epigallocatechin-3-gallate (EGCG) [9] and quercetin [10, 11] induce a varied set of antioxidant mechanisms in diverse organs or cultured cells. The protective effect of these compounds is related to their function sequestering ROS and/or maintaining the cell components in their correct redox state [8]. Consequently, activation of several cyto-protective proteins, such as antioxidant and detoxifying enzymes, seems to represent a novel mechanism of the chemoprevention of natural polyphenols [9]. In line with this idea, we have recently reported that the cocoa polyphenolic extract that prevented the cell damage induced by oxidative stress [6] exercises such protection by up-regulating antioxidant enzymes activity through extracellular-regulated kinases (ERKs) pathway [12].

On the other hand, flavanols bioavailability is restricted, and their biological effects on internal tissues and organs might be compromised [13]. However, all ingested polyphenolic compounds are expected to exert their biological actions at the gastrointestinal level, making the research on these organs highly interesting. There is an increasing interest in studying the response mechanisms of intestinal epithelium to oxidative stress and the capacity of dietary antioxidants to increase the endogenous defences and turn into protective instruments against the development of intestinal pathologies. The study of the antioxidant response in colonic cells may benefit from the use of an established cell culture line such as human Caco2. This cell line is widely used for biochemical and nutritional studies as a cell culture model of human colonocytes since they retain their morphology and most of their function in culture [14].

Therefore, a comparative study of the effects of four main dietary flavanols on the underlying mechanisms of the antioxidant response of colon-derived cells to an oxidative challenge has been carried out. From the wide set of flavanols present in foodstuffs, four representative compounds were selected for the study (see Fig. 1 for chemical structures). Since cell intake of dimers and larger

Fig. 1 Chemical structure of the studied flavanols



molecules might be limited, flavanol monomers were preferred to their bigger counterparts. Hence, the most abundant simple monomer, EC, an abundant gallo-derivative of EC, epicatechin-3-gallate (ECG), a widely studied gallo-derivative of ECG most common in tea, EGCG, and the most abundant of the cocoa procyanidins, procyanidin B2 (PB2), were tested and compared in this study.

Materials and methods

Reagents

Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) and fluorescein were from Aldrich Chemicals Co. (Guillingam, Dorset, UK). Gallic acid, EC, *tert*-butyl hydroperoxide (t-BOOH), *o*-phthalaldehyde (OPT), glutathione reductase (GR), reduced and oxidised glutathione, nicotin adenine dinucleotide reduced salt (NADH), nicotin adenine dinucleotide phosphate reduced salt (NADPH), dichlorofluorescein (DCFH), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid (ABTS), gentamicin, penicillin G and streptomycin were purchased from Sigma Chemical (Madrid, Spain). ECG, EGCG and PB2 were purchased from Extrasynthese (Genay, France). Cell proliferation ELISA BrdU (colorimetric) assay kit was from Roche Diagnostics (Roche Molecular Biochemicals, Barcelona, Spain). The Bradford reagent was from BioRad Laboratories S.A. (Madrid, Spain). Other reagents were of analytical or chromatographic quality. Cell culture dishes were from Falcon (Cajal, Madrid, Spain).

Antioxidant capacity of the selected flavanols

The antioxidant capacity of the four different flavanols was evaluated by two different methods. The ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay adapted to a plate reader [15] was used to estimate the reducing power of samples and measured the increase in absorbance at 595 nm of the complex TPTZ-Fe(II) in the presence of reducing agents. The capacity of samples to scavenge the stable radical ABTS^{•+} was determined by the Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) discoloration assay [16], measuring the absorbance decrease at 730 nm of the radical cation ABTS^{•+}. In both assays, FRAP and TEAC, a synergy HT-multimode microplate reader with automatic reagent dispenser and temperature control from Biotek Instruments (Winooski, VT) was used and Biotek Gen5 data analysis software was applied. All reaction mixtures were prepared in duplicates, and four independent assays were performed for each sample. Trolox stock solutions were prepared to

perform the calibration curves. Results were expressed as μ M equivalents of Trolox.

Cell culture

Human Caco2 cells were grown in a cell incubator containing 5% CO₂ and 95% air at 37 °C. They were grown in DMEM F-12 medium from Biowhitaker (Lonza, Madrid, Spain), supplemented with 10% Biowhitaker foetal bovine serum (FBS) and 50 mg/L of each of the following antibiotics: gentamicin, penicillin and streptomycin. Since the high amount of serum added to the medium favours growth of the cell line but might interfere in the running of the assays and affect the results, cell culture plates were changed to FBS-free medium the day before the assay.

Cell treatment

In order to study the cellular effect of the selected flavanols, three different concentrations of the four compounds, 1, 5 and 10 μ M, dissolved in 50% methanol and diluted in serum-free culture medium, were added to the cell plates for 20 h. Stock solutions of 10 mM of each flavanol were diluted at least 1,000 times in culture medium before being added to the cells, resulting in a maximum of 0.05% of methanol. Addition of this amount of methanol to control cells evoked no significant changes in any tested parameter when compared to methanol-free controls [10]. At the end of the incubation period, cell cultures were processed depending on the assay. In the experiments to evaluate the protective effect of the flavanols against an oxidative insult, cells were pre-treated only with the 10 μ M concentration of the flavanols for 20 h. Then, the medium was discarded and fresh medium containing 400 μ M t-BOOH was added for 1 (ROS assay), 4 (caspase 3 activity) or 6 (cell viability) hours, after which the cell cultures were processed depending on the assay.

Determination of cell viability by the lactate dehydrogenase leakage assay

Cells were treated as described in the previous section. After the different treatments, the culture medium was collected and the cells were scraped in PBS. Cells were first submitted to ultrasound to ensure breaking down the cell membrane to release the total amount of lactate dehydrogenase (LDH), then, after centrifugation to clear up the cell sample, 10 μ L were placed in a 96-well plate for the assay. Similarly, 10 μ L of each culture medium was also deposited in a 96-well plate. A minimum of four samples were run in duplicate. The LDH leakage was

estimated from the ratio between the LDH activity in the culture medium and that of the whole cell content [17].

Cell proliferation assay (5-bromo-2'-deoxyuridine assay, BrdU)

A colorimetric immunoassay (ELISA) was used for the quantification of cell proliferation. This method is based on the measurement of BrdU incorporation into genomic DNA during DNA synthesis of proliferating cells. Caco2 cells were seeded (10^4 cells per well) in 96-well plates, grown for 20 h and labelled with BrdU for 4 h. Then, the anti-BrdU antibody was added, and the immune complexes were detected by the reaction with tetramethylbenzidine and quantified by measuring the absorbance at 620 nm in a microplate ELISA reader. A minimum of six samples were run in duplicate.

Determination of ROS

Cellular ROS were quantified by the dichlorofluorescein (DCFH) assay using a microplate reader [18]. For the assay of direct effect of flavanols, cells were seeded in 24-well plates at a rate of 2×10^5 cells per well and changed to FBS-free medium and the different flavanol concentrations the day after. After 20 h, 5 μ M DCFH was added to the wells for 30 min at 37 °C, cells were washed twice with PBS, placed in fresh serum-free medium plus flavanols and ROS production was monitored for 60 min. For the protection assay, cells were seeded and treated with flavanols for 20 h as above, then 5 μ M DCFH was added to the wells for 30 min at 37 °C, and cells were washed twice with PBS before adding 0.5 mL per well of 400 μ M t-BOOH for 60 min. Multiwell plates were immediately measured (time 0) in a fluorescent microplate reader at excitation wavelength of 485 nm and emission wavelength of 530 nm. A minimum of four samples were run per condition. After being oxidised by intracellular oxidants, DCFH will become dichlorofluorescein (DCF) and emit fluorescence. By quantifying fluorescence over a period of 90 min, a reliable estimation of the overall oxygen species generated under the different conditions was obtained.

Determination of reduced glutathione

The content of glutathione (GSH) was evaluated by the fluorometric assay of Hissin and Hilf [19]. The method takes advantage of the reaction of GSH with OPT at pH 8.0. After the different treatments, the culture medium was removed and cells were detached and homogenised by ultrasound with 5% trichloroacetic acid containing 2 mM EDTA. Following centrifugation of cells for 30 min at 3,000 rpm, 50 μ L of the clear supernatant were transferred

to a 96-multiwell plate for the assay. A minimum of four samples were run in duplicate. Fluorescence was measured at an emission wavelength of 460 nm and an excitation wavelength of 340 nm. The results of the samples were referred to those of a standard curve of GSH. The precise protocol has been described elsewhere [10].

Determination of glutathione peroxidase, glutathione reductase and glutathione-S-transferase activity

For the assay of the glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR) activity, treated cells were suspended in PBS and centrifuged at 300g for 5 min to pellet cells. Cell pellets were resuspended in 20 mM Tris, 5 mM EDTA and 0.5 mM mercaptoethanol, sonicated and centrifuged at 3,000g for 15 min. Enzyme activities were measured in the supernatants. Determination of GPx activity is based on the oxidation of GSH by GPx, using t-BOOH as a substrate, coupled to the disappearance of NADPH by GR [20]. GR activity was determined by following the decrease in absorbance due to the oxidation of NADPH utilised in the reduction of oxidised glutathione [21]. The methods have been previously described [10]. Analysis of GST was carried out by the Biovision Commercial kit GST fluorometric activity assay (Biovision, Mountain View, CA), and the activity obtained in mU/mg protein was expressed as per cent of control values. A minimum of four samples were run per condition. Protein was measured by using the Bradford reagent.

Fluorometric determination of caspase 3 activity

Caspase-3 activity was measured as previously described [22]. Briefly, cells were lysed in a buffer containing 5 mmol/L Tris (pH 8), 20 mmol/L EDTA and 0.5% Triton-X100 and treated with a reaction mixture containing 20 mmol/L HEPES (pH 7), 10% glycerol, 2 mmol/L dithiothreitol, 30 μ g protein and 20 μ mol/L Ac-DEVD-AMC (*N*-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-methylcoumarin) as substrate. A minimum of four samples were run in duplicate per condition. Enzymatic activity was measured at excitation wavelength of 380 nm and emission wavelength of 440 nm.

Statistics

Statistical analysis of data was as follows: prior to analysis, data were tested for homogeneity of variances by the test of Levene; for multiple comparisons, one-way ANOVA was followed by a Bonferroni test when variances were homogeneous or by Tamhane test when variances were not homogeneous. The level of significance was $p < 0.05$. A SPSS version 15.0 program has been used.

Table 1 Antioxidant capacities of flavanol standards

Concentration Flavanols (μM)	FRAP (μM of Trolox equivalents)				TEAC (μM of Trolox equivalents)			
	EC	ECG	EGCG	PB2	EC	ECG	EGCG	PB2
10	58.5 ± 0.9 ^a	107.7 ± 0.6 ^b	110 ± 0.56 ^b	100.7 ± 9 ^b	79 ± 2.9 ^a	125 ± 1.4 ^b	138 ± 2.8 ^c	138 ± 9.7 ^c
25	152.7 ± 2.8 ^a	257.3 ± 3 ^b	261.5 ± 1.8 ^b	261.5 ± 5 ^b	150 ± 5 ^a	249 ± 8 ^{bc}	265 ± 4.8 ^c	235 ± 11 ^b
50	298.5 ± 1 ^a	471 ± 3.2 ^b	485.2 ± 7.54 ^b	578 ± 14 ^c	343 ± 1.9 ^a	421 ± 1.4 ^b	420 ± 2.3 ^b	430 ± 5 ^c
75	435.5 ± 6.6 ^a	679.2 ± 6 ^b	677.6 ± 5.8 ^b	856 ± 4.1 ^c	413 ± 16.7 ^a	473 ± 0.89 ^b	475 ± 1.2 ^b	463 ± 3 ^b
100	586 ± 3.1 ^a	858.8 ± 4.5 ^b	902.8 ± 9.7 ^c	948 ± 12.2 ^d	458 ± 1.2 ^a	475 ± 1.2 ^c	475 ± 0.3 ^c	468 ± 1 ^b

Flavanols were measured at the indicated μM concentrations. Values are expressed in micromolar Trolox equivalents and represent the means (±SD) of four different samples per condition. Within each assay, means with different superscript letter differ, $p < 0.05$

Results

In vitro antioxidant capacity of pure flavanols

A comparative analysis of in vitro antioxidant capacity of the four different flavanols selected for this study was carried out by two quantitative methods, FRAP and ABTS. A dose–response between 10 and 100 μM was tested for each flavanol. The results depicted in Table 1 show that, especially at low doses, ECG, EGCG and PB2 had comparable antioxidant capacities in both assays, whereas antioxidant capacity of EC was half of that of the other three compounds.

Effect of flavanols on Caco2 cell viability and proliferation

Treatment of Caco2 cells for 20 h with the selected flavanols evoked no changes in cell viability, indicating that the concentrations selected for the study did not damage cell integrity during the period of incubation (data not shown). Similarly, treatment with any of the four flavanols did not significantly affect cell growth, suggesting no impairment of Caco2 cell proliferative machinery (data not shown). Thus, long-term incubation of Caco2 with the flavanols at up to 10 μM evoked no cell injury and maintained a regular cell cycle.

Effect of flavanols on ROS production and GSH concentration in Caco2 cells

Treatment of Caco2 cells for 20 h with the four flavanols evoked a significant dose-dependent reduction in the cellular ROS generation (Fig. 2a). Concentrations of 5 and 10 μM of all four compounds significantly reduced ROS levels but only PB2 decreased ROS at 1 μM. On the other hand, none of the compounds at any dose tested evoked changes in the cell concentration of reduced glutathione (Fig. 2b).

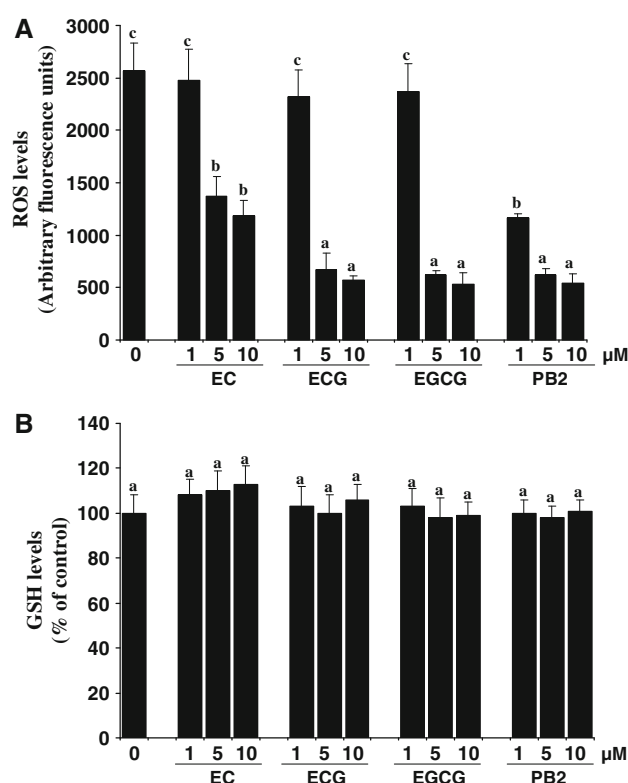


Fig. 2 Effect of flavanols on intracellular ROS generation and GSH concentration. ROS production and GSH concentration were determined in Caco2 cells treated with the noted concentrations of flavanols during 20 h. **a** ROS production is expressed as arbitrary fluorescence units. **b** GSH values are expressed as per cent of control values. Data are means ± SD of 4–6 different samples per condition. Different letters over bars indicate statistically significant differences ($p < 0.05$)

Effect of flavanols on the activity of antioxidant/detoxification enzymes in Caco2 cells

Caco2 cells were treated for 20 h with the four flavanols, and activity of GPx, GR and GST was determined. EC and EGCG evoked no changes in activity of any of the tested enzymes, whereas treatment with 1–10 μM ECG induced an increase in GPx activity (Fig. 3). The most outstanding

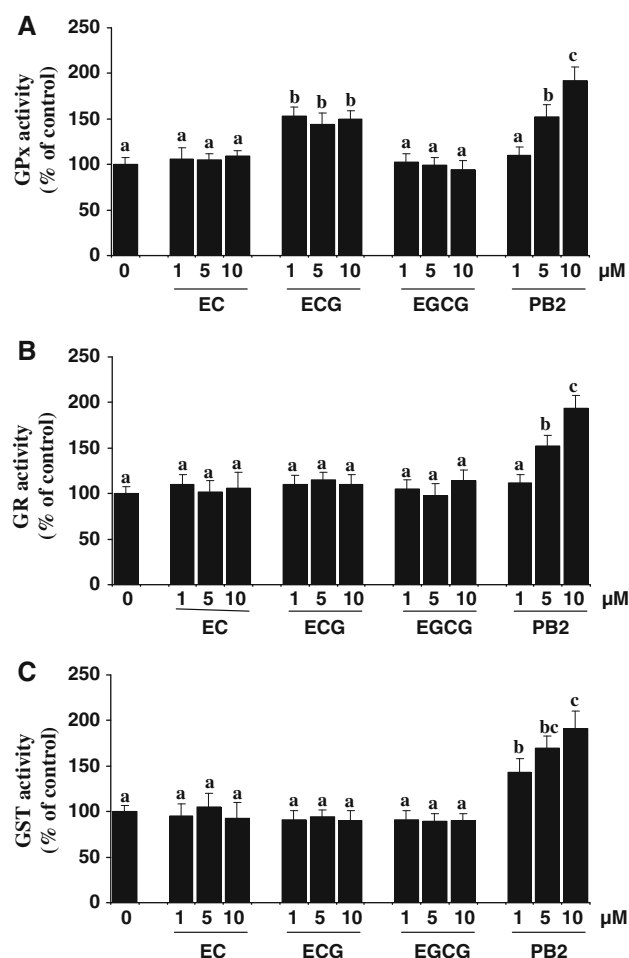


Fig. 3 Effect of flavanols on the activity of antioxidant/detoxification enzymes. Caco2 cells were treated with 1–10 µM of noted flavanols for 20 h. GPx (a), GR (b) and GST (c) activities were measured as described in “Materials and methods”. Values expressed as per cent of control are means of four different samples per condition. Means without a common letter in the same plot differ, $p < 0.05$

results were observed when Caco2 cells were submitted to PB2. Figure 3 shows that this procyanidin induced a dose-dependent increase in glutathione-*S*-transferase (1–10 µM) and glutathione peroxidase and reductase (5–10 µM).

Induction of oxidative stress in Caco2 cells

In order to generate a condition of cellular oxidative stress, Caco2 cells were submitted to 200 or 400 µM t-BOOH, a strong prooxidant, and ROS production at 15, 30 and 60 min and cell damage at 2, 4 and 6 h were evaluated. Figure 4 depicts significant dose- and exposure time-dependent increases in ROS generation (Fig. 4a) and per cent of cell death (Fig. 4b). To further elucidate whether cell death was due to apoptosis, caspase 3 activity was tested in Caco2 cells treated with t-BOOH. A significant increase in caspase 3 was observed after treatment with the prooxidant for 4 h, which later decreased but remained still

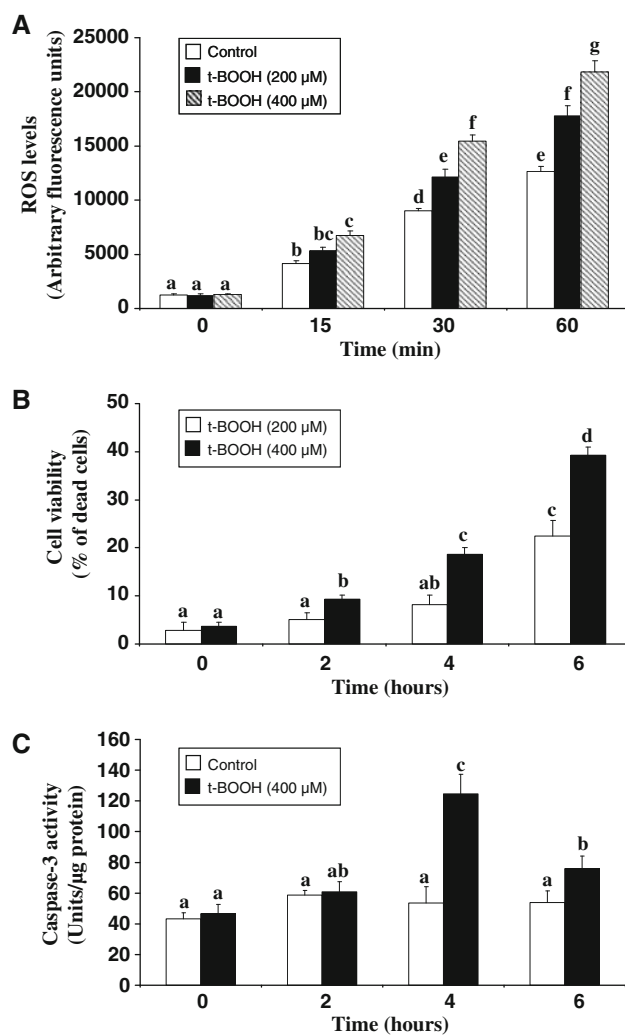


Fig. 4 Effect of t-BOOH on ROS generation, cell viability and caspase-3 activity in Caco2 cells. **a** Cells were exposed to 200 or 400 µM t-BOOH and intracellular ROS production was evaluated at 0, 15, 30 and 60 min. **b** Cells were treated during 2, 4 and 6 h with 200 or 400 µM t-BOOH and cell viability was measured by the LDH assay. **c** Cells were treated during 2, 4 and 6 h with 400 µM t-BOOH and caspase-3 activity (units/µg protein) was assayed as described in “Materials and methods”. Data represent means \pm SD of 4–6 samples per condition. Different letters denote statistically significant differences, $p < 0.05$

elevated over controls after 6 h (Fig. 4c). These results indicate that treatment of Caco2 cells with 400 µM t-BOOH induces a remarkable oxidative stress that triggers the apoptotic process at 4 h and evokes around 40% mortality in cell population at 6 h. These harsh conditions will be used to test the protective effect of the selected flavanols.

Protective effect of flavanols against an oxidative stress induced in Caco2

In view of the significant differences observed among the four flavanols in their in vitro antioxidant capacity, ROS

reduction ability and antioxidant defences activation, the protective effect of 10 μ M of the selected compounds against an oxidative insult was tested in Caco2 cells. Figure 5a shows that the dramatic increase in ROS generation induced in Caco2 cells by t-BOOH was significantly reduced by half (EC) or completely (ECG, EGCG and PB2) when the cells were pre-treated 20 h with the flavanols. This remarkable decrease in ROS levels and, consequently, in the oxidative stress condition leads to an impressive decline of Caco2 cell death, as shown in Fig. 5b. The three flavanols that entirely prevented the t-BOOH-induced ROS increase, ECG, EGCG and PB2,

restricted cell death at 6 h to values similar to those of control cells never submitted to the stress. Treatment of Caco2 cells with EC that decreased the t-BOOH-induced ROS production by half reduced cell death to about 40% of those cells plainly submitted to the pro-oxidant. In agreement with all the above, the increase in caspase 3 activity induced by t-BOOH at 4 h was prevented to a great extent when cells were pre-treated with the flavanols. The degree of diminution in caspase 3 activity was directly related to the extent of cell protection, EC being the less efficient and PB2 the flavanol with the highest protective effect (Fig. 5c).

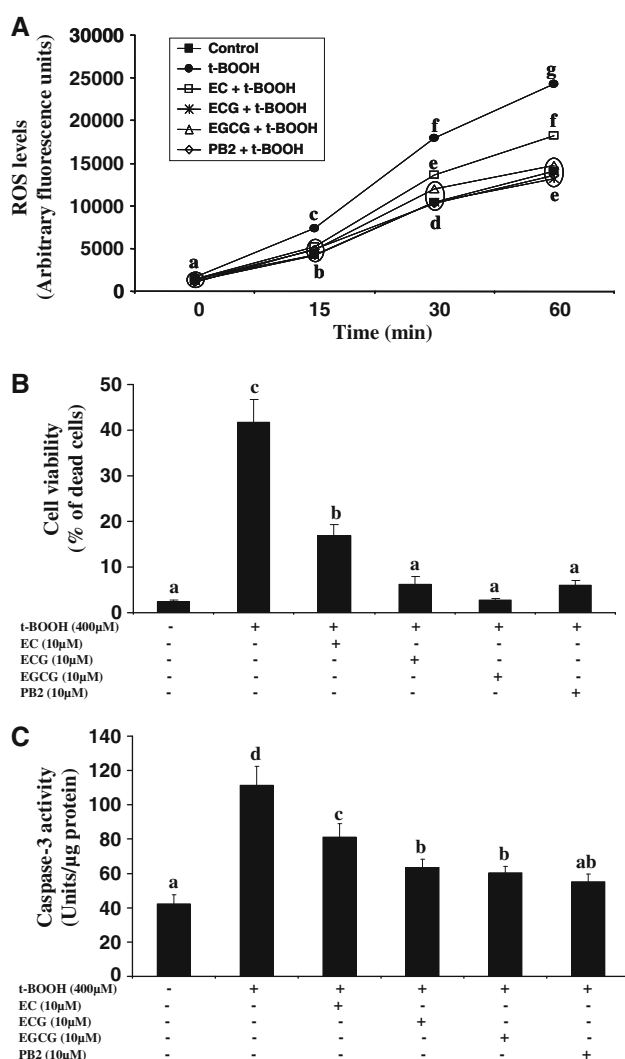


Fig. 5 Protective effect of flavanols against oxidative stress and apoptosis in Caco2 cells. Cells were treated with 10 μ M of flavanols for 20 h, then submitted to t-BOOH and ROS production evaluated at 0, 15, 30 and 60 min (panel a); submitted to t-BOOH for 6 h and cell viability measured by the LDH assay (panel b); or submitted to t-BOOH for 4 h and caspase-3 activity (units/ μ g protein) assayed as described in “Materials and methods” (panel c). Data represent means \pm SD of 4–6 samples per condition. Different letters denote statistically significant differences, $p < 0.05$

Discussion

Biological activities of flavanols are similar to those reported for other natural flavonoids and include prevention of LDL oxidation [23], scavenging of active oxygen species [24], inhibition of tumour cell growth [25] and anti-inflammatory activity [26]. All these properties make dietary flavanols interesting candidates for cellular chemoprotection. The biological actions of phenolics have been ascribed to their antioxidant capacity, such as free radical scavenging and chelation of redox active metal ions [27], as well as to their interaction with cell signalling pathways and regulation of gene expression [28]. In concert, we have recently shown that a cocoa polyphenolic extract [6] and, in particular, the flavanol EC [7] protect liver-derived cells from an oxidative stress by returning the antioxidant defence system to a steady-state activity diminishing, therefore, cell damage and enabling the cell to cope in better conditions with further oxidative insults. Additionally, we have further demonstrated that EC-induced cell survival is partially mediated by activation of signalling pathways [29]. The concentration range between 1 and 10 μ M used in the present study is not far from realistic since steady-state concentrations up to 35 μ M of EC have been reported in rat serum 1 h after gavage administration of the flavanol [13]. Although flavanol bioavailability is limited, intakes as high as 30–50 mg per day of flavanols have been reported [30, 31]. In particular, dimers such as PB2 that are slightly absorbed are not conjugated or methylated, maintaining their biological activity after absorption and contributing to their systemic effect [32].

Due to their phenolic structure, flavanols have a remarkable oxidant-scavenging capacity related to the hydrogen donating ability and the stability of the phenoxyl radicals formed [27]. Our results of in vitro antioxidant capacity are in substantial agreement with previous reports [33, 34]; hence, the sequence for the antioxidant capacity for monomeric flavanols is EGCG = ECG > EC. However, contrary to Soobrattee et al. [34] who reported TEAC

values for PB2 twofold those for ECG and EGCG, our data from both methods show that PB2 antioxidant capacity was equivalent to that of EGCG and ECG. In fact, the results of the antioxidant capacity *in vitro* with 10 μM seem to support the antioxidant effect observed in cultured live cells with the same dose; consequently, a similar reduction of ROS production was observed in Caco2 treated with PB2, ECG and EGCG, showing EC the lowest potential for ROS reduction. Therefore, treatment of Caco2 in culture with physiological concentrations of flavanols considerably decreases the steady-state generation of ROS, thus preventing or delaying conditions that cause oxidative stress in the cell. Furthermore, treatment of Caco2 cells with flavanols did not affect GSH concentration, maintaining the cell antioxidant reserve to face a potential oxidative challenge [10, 35].

In addition to their antioxidant capacity by directly scavenging intracellular ROS, flavanols have been recently shown to provide a parallel protection by enhancing the activity of a number of protective enzymes [8, 12]. GPx catalyses the reduction of peroxides and is suggested to act as a barrier against hydroperoxide attack [12, 36], whereas GR is implicated in recycling oxidised glutathione back to reduced glutathione [12, 37]. GST catalyses the reaction of endogenous GSH with numerous electrophiles to yield less toxic conjugates that are easily eliminated [8]. Therefore, the function of glutathione-dependent enzymes, which participate in the defence against hydrogen peroxides and superoxides, seems to be essential to prevent the cytotoxicity of ROS. We have recently reported that treatment of human HepG2 cells for 20 h with a cocoa polyphenolic extract containing EC, ECG, PB2 and other flavanols in doses ranging from 1.3 nM to 1.3 μM induced a significant increase in GPx and GR activities [12]. Based on these findings, we suggested that one of the mechanisms by which cocoa flavanols inhibited oxidative stress-induced cell death was by preventing ROS accumulation through the improvement of the endogenous antioxidant defence. In the present study, we have found that the most abundant procyanidin in cocoa, PB2, evokes a substantial increase in GPx, GR and GST activity in Caco2 cells. This outcome indicates that PB2-treated Caco2 cells are in better conditions to face the increasing generation of ROS induced by the potent pro-oxidant t-BOOH and consequently to escape cell death.

Although activation of GSH-related enzymes represents an essential instrument of the polyphenolic antioxidant effect [12, 38], the mechanism of action underlying this process is not fully understood. Recent studies have indicated that the effects of flavonoids on antioxidant enzyme expression and activity could be mediated by modification of signal transduction pathways [2, 12, 39]. Dietary compounds can activate a number of cellular kinases including

the mitogen-activation protein kinase (MAPKs) and the phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) [12, 29, 40], and both pathways have been recently implicated in the up-regulation of several antioxidant/detoxification enzyme activities [9, 12]. Even if cell entrance of dimeric structures might be hampered, PB2 could still exercise its biochemical effect through specific membrane receptors and/or defined signalling pathways that are being currently investigated in our model of Caco2 cells. Therefore, low bioavailability of flavanols in colonic cells does not impede their overall biochemical effects while increases their local antioxidant effect at the colon epithelium.

Oxidative stress-induced cell injury results not only from direct chemical interactions by altering cellular macromolecules including DNA, proteins and lipids, but also from alterations in key mediators of stress signals and stress-dependent apoptosis reactions [41]. In this regard, ROS generation has been described as a critical upstream activator of the development of apoptosis [41]. Our previous studies have demonstrated that t-BOOH-induced oxidative stress in HepG2 cells is a useful model for evaluating the cytoprotective effect of natural antioxidants [10, 12]. Alternatively, a concentration of 400 μM t-BOOH has also been considered a pro-apoptotic agent, which is able to induce activation of caspase 3 and, ultimately, HepG2 cell death [12]. Accordingly, here we show that Caco2 cells incubated in the presence of 400 μM t-BOOH undergo apoptosis as evidenced by activation of caspase 3, a very specific and sensitive apoptotic marker, at 4 h. This peak in caspase 3 activity has been previously reported [2, 12], indicating the triggering of the apoptotic process, then caspase 3 activity gradually decreases.

Treatment of cells with natural antioxidants prevents the cytotoxicity induced by oxidative stress inducers through the ability of these compounds to restrain the increase in ROS levels and the subsequent activation of caspase-3 leading to apoptosis [42, 43]. Consistent with the above observations, here we show that the four selected flavanols effectively reduce the apoptotic effects exerted by t-BOOH. Thus, pre-treatment of Caco2 cells with flavanols before the oxidative insult attenuated (EC) or blunted (ECG, EGCG and PB2) ROS production induced by t-BOOH and protected cells from its necrotic effect as shown by the decreased LDH leakage. In line with these findings, the t-BOOH-induced caspase 3 activation was also partly (EC, ECG and EGCG) or completely (PB2) prevented in cultured cells pre-treated with the flavanols.

Based on our results, we suggest that at least two mechanisms are involved in the protection of Caco2 cells afforded by flavanols: (a) their inherent antioxidant capacity to quench ROS and (b) the improvement of the endogenous antioxidant defences. In our conditions, EC showed the lowest ROS reduction capacity and,

consequently, the smallest ability to reduce caspase 3 activity and to preserve cell viability. The rest of the flavanols completely prevented ROS production and cell death, but only PB2 thoroughly blunted the apoptotic process. Interestingly, PB2 is the only flavanol tested in this study that additionally increased the activity of the antioxidant/detoxification enzymes. This result is in line with recent data from our laboratory indicating that PB2 enhances signalling pathways involved in antioxidant enzymes activation (unpublished data).

In summary, flavanols exert a protective effect in Caco2 cells against t-BOOH-induced oxidative stress and subsequent cell death. This effect was associated with a reduced ROS production and prevention of caspase 3 activation. In particular, PB2 increases the activity of antioxidant/detoxification enzymes and thus protects Caco2 cells against oxidative stress-induced apoptosis by directly counteracting free radicals and also by activating the antioxidant defence system. Therefore, dietary flavanols may largely contribute to the protection given by fruits, vegetables and plant-derived beverages against diseases in which oxidative stress has been implicated as a causal or contributory factor.

Acknowledgments This work was supported by grant AGL2007-64042/ALI and project CSD 2007-00063 from Programa Consolidar-Ingenio from the Spanish Ministry of Education and Science (CICYT). I. Rodríguez-Ramiro is a predoctoral fellow of the JAE predoc program at Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

References

- Sohal RS, Mockett RJ, Orr WC (2002) Mechanisms of aging. An appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Radic Biol Med* 33:575–586
- Ramos S (2008) Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signalling pathways. *Mol Nutr Food Res* 52:507–526
- Mukhtar H, Ahmad N (2000) Tea polyphenols: prevention of cancer and optimizing health. *Am J Clin Nutr* 71:1698S–1702S
- Ahn WS, Yoo J, Huh SW, Kim CK, Lee JM, Namkoong SE, Bae SM, Lee IP (2003) Protective effects of green tea extracts (polyphenon E and EGCG) on human cervical lesions. *Eur J Cancer Prev* 12:383–390
- Bettuzzi S, Rizzi F, Belloni L (2007) Clinical relevance of the inhibitory effect of green tea catechins (GtCs) on prostate cancer progression in combination with molecular profiling of catechin-resistant tumors: an integrated view. *Pol J Vet Sci* 10:57–60
- Martín MA, Ramos S, Mateos R, Granado-Serrano AB, Izquierdo-Pulido M, Bravo L, Goya L (2008) Protection of human HepG2 cells against oxidative stress by cocoa phenolic extract. *J Agric Food Chem* 56:7765–7772
- Martín MA, Ramos S, Mateos R, Izquierdo-Pulido M, Bravo L, Goya L (2010) Protection of human HepG2 cells against oxidative stress induced by the flavonoid epicatechin. *Phytother Res* 24:503–509
- Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C (2005) Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem* 16:577–586
- Na HK, Surh YJ (2008) Modulation of Nrf2-mediated antioxidant and detoxifying enzyme induction by the green tea polyphenol EGCG. *Food Chem Toxicol* 46:1271–1278
- Alía M, Mateos R, Ramos S, Lecumberri E, Bravo L, Goya L (2006) Influence of quercetin and rutin on growth and the anti-oxidant defense system in a human hepatoma cell line (HepG2). *Eur J Nutr* 45:19–28
- Molina MF, Sanchez-Reus I, Iglesias I, Benedi J (2003) Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects against ethanol induced oxidative stress in mouse liver. *Biol Pharm Bull* 26:1398–1402
- Martín MA, Granado-Serrano AB, Ramos S, Izquierdo-Pulido M, Bravo L, Goya L (2010) Cocoa flavonoids up-regulate antioxidant enzymes activity via ERK1/2 pathway to protect against oxidative stress-induced apoptosis in HepG2 cells. *J Nutr Biochem* 21:196–205
- Baba S, Osakabe N, Natsume N, Muto Y, Takizawa T, Terao J (2001) In vivo comparison of the bioavailability of catechin, epicatechin and their mixture in orally administered rats. *J Nutr* 131:2885–2891
- Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G, Scarino ML, Stamatii A, Zucco F (2005) The Caco2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol* 21:1–26
- Rufián-Henares JA, Morales FJ (2007) Effect of in vitro enzymatic digestion on antioxidant activity of coffee melanoidins and fractions. *J Agric Food Chem* 55:10016–10021
- Martín MA, Ramos S, Mateos R, Rufián-Henares JA, Morales FJ, Bravo L, Goya L (2009) Biscuit melanoidins of different molecular masses protect human HepG2 cells against oxidative stress. *J Agric Food Chem* 57:7250–7258
- Welder AA, Acosta D (1994) Enzyme leakage as an indicator of cytotoxicity in culture cells. In: Tyson CA, Franzier JM (eds) *In vitro toxicity indicators: methods in toxicology*. Academic Press, New York, pp 46–49
- Wang H, Joseph JA (1999) Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med* 27:612–616
- Hissin PJ, Hilf R (1976) A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem* 74:214–226
- Gunzler WA, Kramers H, Flohe L (1974) An improved coupled test procedure for glutathione peroxidase. *Klin Chem Klin Biochem* 12:444
- Goldberg DM, Spooner RJ (1987) Glutathione reductase. In: Bergmeyer HV (ed) *Methods of enzymatic analysis*. Verlag-Chemie, Weinheim, pp 258–265
- Herrera B, Fernández M, Alvarez A, Roncero C, Benito M, Gil J, Fabregat I (2001) Activation of caspases occurs downstream from radical oxygen species production, Bcl-xL down-regulation, and early cytochrome C release in apoptosis induced by transforming growth factor beta in rat fetal hepatocytes. *Hepatology* 34:548–556
- Steffen Y, Jung T, Klotz L-O, Schewe T, Grune T, Sies H (2007) Protein modification elicited by oxidized LDL in endothelial cells: protection by epicatechin. *Free Radic Biol Med* 42:955–970
- Natsume M, Osakabe N, Yasuda A, Baba S, Tokunaga T, Kondo K, Osawa T, Terao J (2004) In vitro antioxidative activity of epicatechin glucuronide metabolites present in human and rat plasma. *Free Radic Res* 38:1341–1348
- Jourd'ain C, Tenca G, Degueray A, Troplin P, Poelman D (2006) In vitro effects of polyphenols from cocoa and beta sitosterol on the growth of human prostate cancer and normal cells. *Eur J Cancer Prev* 4:353–361

26. Ramiro E, Franch A, Castellote C, Pérez-Cano F, Permanyer J, Izquierdo-Pulido M, Castell M (2005) Flavonoids from Theobroma cacao down-regulate inflammatory mediators. *J Agric Food Chem* 53:8506–8511
27. Rice-Evans C (2004) Flavonoids and isoflavones: absorption, metabolism and bioactivity. *Free Radic Biol Med* 36:827–828
28. Chang W-T, Shao Z-H, Yin J-J, Mehendale S, Wang CZ, Qin Y, Li J, Chen WJ, Chien CT, Becker LB, Van den Hoek TL, Yuan CS (2007) Comparative effects of flavonoids on oxidant scavenging and ischemia-reperfusion injury cardiomyocytes. *Eur J Pharmacol* 566:58–66
29. Granado-Serrano AB, Martín MA, Izquierdo-Pulido M, Goya L, Bravo L, Ramos S (2007) Molecular mechanisms of (–)-epicatechin and chlorogenic acid on the regulation of the apoptotic and survival/proliferation pathways in a human hepatoma cell line (HepG2). *J Agric Food Chem* 55:2020–2027
30. Arts IC, van de Putte B, Hollman PC (2000) Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. 1. Fruits, vegetables, staple foods and processed foods. *J Agric Food Chem* 48:1746–1751
31. De Pascual-Teresa S, Santos-Buelga C, Rivas-Gozalo JC (2000) Quantitative analysis of flavan-3-ols in Spanish foodstuffs and beverages. *J Agric Food Chem* 48:5331–5337
32. Appeldoorn MM, Vincken JP, Gruppen H, Hollman PC (2009) Procyanidin dimers A1, A2 and B2 are absorbed without conjugation or methylation from the small intestine of rats. *J Nutr* 139:1469–1473
33. Luximon-Ramma A, Bahorun T, Crozier A, Zbarsky V, Datla KP, Dexter DT, Aruoma OI (2005) Characterization of the antioxidant functions of flavonoids and proanthocyanidins in Mauritian black teas. *Food Res Int* 38:357–367
34. Soobrattee MA, Neergheen VS, Luximon-Ramma A, Aruoma OI, Bahorun T (2005) Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents. *Mutat Res* 579:200–213
35. Scharf G, Prustomersky S, Knasmüller S, Schulte-Hermann R, Huber WW (2003) Enhancement of glutathione and g-glutamylcysteine synthetase, the rate limiting enzyme of glutathione synthesis, by chemoprotective plant-derived food and beverage components in the human hepatoma cell line HepG2. *Nutr Cancer* 45:74–83
36. Lei XG, Cheng W-H, McClung JP (2007) Metabolic regulation and function of glutathione peroxidase-1. *Annu Rev Nutr* 27:41–61
37. Argyrou A, Blanchard JS (2004) Flavoprotein disulfide reductases: advances in chemistry and function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 78:89–142
38. Masella R, Vari R, D'Archivio M, Di Benedetto R, Matarese P, Malorni W, Scaccocchio B, Giovannini C (2004) Extra virgin olive oil biophenols inhibit cell-mediated oxidation of LDL by increasing the mRNA transcription of glutathione-related enzymes. *J Nutr* 134:785–791
39. Ramiro Puig E, Urpí-Sardá M, Pérez-Cano FJ, Franch A, Castellote C, Andrés-Lacueva C, Izquierdo-Pulido M, Castell M (2008) Cocoa-enriched diet enhances antioxidant enzyme activity and modulates lymphocyte composition in thymus from young rats. *J Agric Food Chem* 55:6431–6438
40. Chen C, Kong AN (2004) Dietary cancer-chemopreventive compounds: from signaling and gene expression to pharmacological effects. *Free Radic Biol Med* 36:1505–1516
41. Singh R, Czaja MJ (2007) Regulation of hepatocyte apoptosis by oxidative stress. *Gastroenterol Hepatol* 1:S45–S48
42. De Ruvo C, Amodio R, Algeri S, Martelli N, Intilangelo A, D'Ancona GM, Esposito E (2000) Nutritional antioxidants as antidegenerative agents. *Int J Dev Neurosci* 18:359–366
43. Granado-Serrano AB, Martín MA, Goya L, Bravo L, Ramos S (2009) Time course regulation of survival pathways by epicatechin on HepG2. *J Nutr Biochem* 20:115–124

Capítulo 2

Estudio de los mecanismos moleculares de protección de los flavonoides del cacao frente al estrés oxidativo inducido por un tóxico alimentario en células intestinales Caco-2

Resumen

El actual ritmo de vida resta cada vez más tiempo a la elaboración de las comidas y crea una tendencia hacia un estilo de alimentación conocido como *fastfood* o comidas rápidas. Este estilo de alimentación se caracteriza por un consumo elevado de alimentos procesados térmicamente, con un alto aporte calórico en grasas saturadas y un bajo contenido en fibra, calcio y vitaminas¹⁵⁶⁻¹⁵⁷. Se ha descrito que el mecanismo de respuesta a una alta ingesta de grasas es el aumento de los ácidos biliares en el lumen del colon, generando estados de estrés oxidativos posprandiales, que pueden llegar a producir la muerte de las células de la mucosa intestinal¹⁰⁶. Además durante muchos de los procesos térmicos de los alimentos se producen reacciones secuenciales, denominadas reacciones de Maillard que dan lugar a productos finales de glicación avanzada (AGE)¹⁰⁵. Shangari y colaboradores, 2007¹⁰⁵ han demostrado en animales de experimentación que alimentos procesados térmicamente producen estrés oxidativo, una disminución de las defensas antioxidantes e incluso la infiltración de macrófagos en la mucosa intestinal. En los últimos años, además, se ha producido una alarma social en el ámbito de la salud pública tras anunciarse la presencia de acrilamida en alimentos consumidos habitualmente como las patatas fritas, los cereales, la bollería o el café¹⁵⁸. La acrilamida es un compuesto formado durante las reacciones de Maillard con efectos neurotóxicos, genotóxicos y carcinogénicos¹⁵⁹. De esta manera, el consumo habitual de este tipo de alimentos puede llegar a constituir un riesgo para la salud, especialmente en el intestino, donde se acumulan muchas de estas sustancias tóxicas antes de ser metabolizadas y excretadas por el organismo.

Las defensas enzimáticas que se expresan en el intestino son la primera línea de defensa frente a los tóxicos y los carcinógenos presentes en los alimentos¹⁶⁰. El cacao es una fuente de flavanoles, que pueden producir efectos beneficiosos en el intestino. Previamente, se ha demostrado que el tratamiento directo con uno de los principales flavanoles del cacao, la PB2, aumenta la actividad de las defensas enzimáticas antioxidantes/detoxificantes en la línea celular Caco-2. Este hecho ha sugerido que los polifenoles del cacao podrían proteger frente a los daños ocasionados en la mucosa intestinal por tóxicos de los alimentos como la acrilamida. Así, se ha llevado a cabo un estudio *in vitro* utilizando los flavonoides mayoritarios del cacao, la EC y la PB2 así como un extracto polifenólico de cacao (CPE) de la variedad Natural Forastero, previamente caracterizado por Martín y colaboradores, 2008¹⁶¹. En este estudio se ha encontrado que la acrilamida produce una disminución de los niveles de GSH

intracelular y un aumento de los ROS, causando estrés oxidativo. Este desequilibrio oxidativo producido por la acrilamida conduce a la muerte celular, a través de la activación de las vías de las JNKs y de la caspasa-3 efectora del proceso de apoptosis. La toxicidad producida por la acrilamida fue evitada por el pre-tratamiento de las células con el CPE y la PB2, que impidieron la disminución del GSH y el posterior desequilibrio oxidativo que llevaba a la muerte celular. Los compuestos fenólicos promovieron estos efectos a través de un aumento de los niveles de proteínas de las defensas enzimáticas γ -GCS y GST. De forma adicional, se investigó el mecanismo molecular activado por la PB2 para reforzar los niveles de expresión de la isoforma P1 de la enzima detoxificante GST (GSTP1). En este sentido, se encontró que la PB2 era capaz de activar dos importantes quinasas implicadas en la señalización celular, las ERKs y la p38 MAPK, que posteriormente inducían la translocación nuclear del factor de transcripción Nrf2 modulando de esta forma la expresión de la enzima GSTP1.

En conclusión, se ha demostrado que los polifenoles del cacao protegen frente a la toxicidad inducida por la acrilamida en las células intestinales Caco-2. El mecanismo de protección está relacionado principalmente con una mejora del estado redox a través del aumento de los niveles basales de las defensas enzimáticas γ -GCS y GST. En concreto, se ha demostrado que la PB2 induce un aumento de los niveles de expresión génica de la enzima GSTP1 a través de la modulación de señales celulares, ERKs y p38 MAPKs, que activan la translocación al núcleo del factor de transcripción Nrf2. Este aumento en la expresión génica se correlaciona además con una mayor expresión proteica y actividad de esta enzima detoxificante.

Artículo 2

Procyanidin B2 and a cocoa polyphenolic extract inhibit acrylamide-induced apoptosis in human Caco-2 cells by preventing oxidative stress and activation of JNK pathway

Ildefonso Rodríguez-Ramiro · Sonia Ramos · Laura Bravo · Luis Goya ·

María Ángeles Martín

Journal of Nutritional Biochemistry (2011)

DOI:10.1016/j.jnutbio.2010.10.005

Artículo 3

Procyanidin B2 induces Nrf2 translocation and glutathione S-transferase P1 expression via ERKs and p38-MAPK pathways and protect human colonic cells against oxidative stress

Ildefonso Rodríguez-Ramiro · Sonia Ramos · Laura Bravo · Luis Goya ·

María Ángeles Martín

European Journal of Nutrition (2011)

DOI:10.1007/s00394-011-0269-1



Procyanidin B2 and a cocoa polyphenolic extract inhibit acrylamide-induced apoptosis in human Caco-2 cells by preventing oxidative stress and activation of JNK pathway[☆]

Ildefonso Rodríguez-Ramiro, Sonia Ramos, Laura Bravo, Luis Goya, María Ángeles Martín^{*}

Department of Metabolism and Nutrition, Instituto del Frío-ICTAN, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), José Antonio Novais 10, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain

Received 13 May 2010; received in revised form 28 September 2010; accepted 5 October 2010

Abstract

Humans are exposed to dietary acrylamide (AA) during their lifetime; it is therefore necessary to investigate the mechanisms associated with AA induced toxic effects. Accumulating evidence indicates that oxidative stress may contribute to AA cytotoxicity, but the link between oxidative stress and AA cytotoxicity in the gastrointestinal tract, the primary organ in contact with dietary AA, has not been described. In this study, we evaluate the alterations of the redox balance induced by AA in Caco-2 intestinal cells as well as the potential protective role of natural antioxidants such as a well-standardized cocoa polyphenolic extract (CPE) and its main polyphenol components epicatechin (EC) and procyanidin B2 (PB2). We found that AA-induced oxidative stress in Caco-2 cells is evidenced by glutathione (GSH) depletion and reactive oxygen species (ROS) overproduction. AA also activated the extracellular-regulated kinases and the c-Jun N-amino terminal kinases (JNKs) leading to an increase in caspase-3 activity and cell death. Studies with appropriate inhibitors confirmed the implication of oxidative stress and JNKs activation in AA-induced apoptosis. Additionally, AA cytotoxicity was counteracted by CPE or PB2 by inhibiting GSH consumption and ROS generation, increasing the levels of gamma-glutamyl cysteine synthase and glutathione-S-transferase and blocking the apoptotic pathways activated by AA. Therefore, AA-induced cytotoxicity and apoptosis are closely related to oxidative stress in Caco-2 cells. Interestingly, natural dietary antioxidant such as PB2 and CPE were able to suppress AA toxicity by improving the redox status of Caco-2 cells and by blocking the apoptotic pathway activated by AA.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Glutathione; Epicatechin; ROS; Signalling pathways

1. Introduction

In the last years, relevant amounts of acrylamide (AA) have been identified in heat-treated carbohydrate-rich foods such as fried potatoes, cookies, bread and breakfast cereals [1]. Extensive in vivo and in vitro studies have revealed that AA could induce neurotoxic, genotoxic, carcinogenic, developmental and reproductive toxic effects [2]. Therefore, the presence of AA in so commonly ingested foods has originated a great concern because humans could be exposed to significant quantities of AA during their life span.

Most investigations of AA toxicity have mainly focused on their genotoxic and carcinogenic properties; however, accumulating evidences [3–6] seem to indicate that AA also possesses cytotoxic properties by affecting the redox status of the cells. Exposure to AA induces a significant reduction in GSH concentration in different cells [7–9] and contributed to the onset of oxidative stress conditions, which can adversely affect cell function and potentially lead to cell damage and death [10]. However, while previous studies have

documented the link between AA-induced oxidative stress and cytotoxicity in several tissues [3–5], to date, the potential impact of AA on the integrity of gastrointestinal tract, the primary organ in contact with food, is poorly understood.

AA is readily absorbed into the intestinal cells and it is usually non-enzymatically and enzymatically conjugated with glutathione (GSH) resulting in a depletion of cellular GSH stores [11]. The decreased GSH levels, as occurs under various pathological states [12], increase the levels of reactive oxygen species (ROS), which are widely recognized as important mediators of cell function [10]. Hence, increased ROS have been shown to activate signalling cascades involving the mitogen-activated protein kinase (MAPK)-JNKs that play a key role in the regulation of many cellular processes, including apoptosis [10]. Interestingly, studies in intestinal cells [13,14] have demonstrated that loss of cellular glutathione redox balance is an important player in apoptotic signalling and cell death. Therefore, depletion of GSH levels favouring cellular oxidative stress and apoptosis may be suggested as a potential mechanism for AA toxicity.

Considering this, the use of natural compounds derived from the diet with antioxidant effects might provide a strategy to reduce AA toxicity. Among dietary compounds, cocoa and its polyphenol components epicatechin, catechin and procyanidins have exhibited beneficial effects on numerous oxidative-stress related diseases [15]. In addition, cocoa derived products are commonly consumed in many countries in the European Union and the United States [16]. Thus, they

[☆] This work was supported by the grant AGL2007-64042/ALI and project CSD 2007-00063 from Programa Consolider-Ingenio from the Spanish Ministry of Science and Innovation (CICYT). I. Rodríguez-Ramiro is a predoctoral fellow of the Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

^{*} Corresponding author. Tel.: +34 91 544 56 07; fax: +34 91 549 36 27.

E-mail address: amartina@if.csic.es (M.Á. Martín).

can be considered as dietary antioxidants and as natural products with beneficial properties. Cocoa polyphenols have shown to exert their protective action as reducing agents by improving antioxidant defences through the induction of antioxidant and phase II enzymes [17] and also through its ability to modulate certain signalling pathways involved in cell survival and death [18–20]. Furthermore, the fact that the intestinal epithelium can be exposed to high concentrations of some of these polyphenols implies that they could have an important role in the prevention of the potential oxidative stress induced by AA.

Therefore, the aim of the present study was to investigate whether AA is able to induce oxidative stress and apoptosis in Caco-2 cells, a human cell line originating from the gastrointestinal tract that retains many of the morphological and enzymatic features typical of normal human enterocytes. In addition, the likely protective effects on this process of a cocoa polyphenolic extract (CPE) and its polyphenol components epicatechin (EC) and procyanidin B₂ (PB2) individually were also evaluated.

2. Material and methods

2.1. Materials and chemical

EC, N-acetylcysteine (NAC), o-phthalaldehyde (OPT), gentamicin, penicillin G, streptomycin, acrylamide, PD98059 [2-(2-amino-3-methoxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one] and SP600125 [Anthra-(1,9-cd)pyrazol-6(2H)-one] were purchased from Sigma Chemicals (Madrid, Spain). The fluorescent probe 2',7'-dichlorofluorescein diacetate was from Molecular Probes (Eugene, OR, USA). PB2 was purchased from Extrasynthese (Genay, France). Anti-extracellular-regulated kinases (ERKs), antiphospho-ERKs (p-ERKs), anti-c-Jun N-amino terminal kinases (JNKs), antiphospho-JNK (p-JNKs) and anti- β -actin were obtained from Cell Signaling Technology (Izasa, Madrid, Spain). Anti- γ -glutamyl cysteine synthase (γ -GCS) and anti-glutathione-S-transferase (GST) (sc-22755 and sc-66000, respectively) were purchased from Santa Cruz (Quimigen, Madrid, Spain). Caspase-3 substrate (Ac-DEVD-AMC) was purchased from Pharmingen (San Diego, CA, USA). Materials and chemicals for electrophoresis and the Bradford reagent were from BioRad (Madrid, Spain). Cell culture dishes were from Falcon (Cajal, Madrid, Spain) and cell culture medium and fetal bovine serum (FBS) from Biowhitaker Europe (Innogenetics, Madrid, Spain).

2.2. Cocoa polyphenol extraction

Natural Forastero cocoa powder (Nutrexpa, Barcelona, Spain) was used for this study. Soluble polyphenols were extracted by sequentially washing 1 g of sample with 40 ml of 16 mM hydrochloric acid in 50% aqueous methanol (50:50, v/v, 1 h at room temperature, constant shaking) and 40 ml of acetone-water (70:30, v/v, 1 h room temperature, constant shaking) in 50 ml centrifuge tubes [17]. After centrifugation (15 min, 3000×g), supernatants from each extraction step were combined and made up to 100 ml. The desiccated extract was dissolved in distilled water and kept frozen until assay. The total polyphenol content was determined by the spectrophotometric method of Folin-Ciocalteu [17] using gallic acid as standard. A Beckman DU640 spectrophotometer (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA) was used. Analysis of the CPE by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) showed that the extract is composed mostly of epicatechin (383.5 mg/100 g), catechin (116 mg/100 g) and procyanidins (254.5 mg/100 g) and non-flavonoid compounds such as theobromine [17].

2.3. Cell culture and AA and polyphenols treatments

Human Caco-2 cells were grown in a humidified incubator containing 5% CO₂ and 95% air at 37°C. They were grown in Dulbecco's modified Eagle media (DMEM) F-12 medium from Biowhitaker (Lonza, Madrid, Spain), supplemented with 10% Biowhitaker FBS and 50 mg/L of each of the following antibiotics: gentamicin, penicillin and streptomycin. Plates were changed to FBS-free medium the day before the assay.

For the AA treatment, different concentrations of AA (1, 5, 10 and 20 mM), diluted in serum-free culture medium and filtered through a 0.2 μ m membrane, were added to the cell plates for different times. In the experiments with the pharmacological inhibitors, cells were preincubated with 1 mM of NAC (a GSH precursor) or with 50 μ M PD98059 (a specific inhibitor of MAPK-ERK kinase) or with 50 μ M of SP600125 (a specific inhibitor of JNKs) for 1 h before and during AA treatment.

To evaluate the protective effect of cocoa and cocoa flavonoids against AA toxicity, 10 μ M of EC or PB2 or 10 μ g/ml of CPE diluted in serum-free culture medium and filtered through a 0.2 μ m membrane were added to the cell plates for 20 h. After that, the medium was discarded, and fresh medium containing 5 mM of AA was added for different times.

2.4. Cytotoxicity assays

Cellular damage induced by AA was evaluated by crystal violet assay [20] and by lactate dehydrogenase (LDH) leakage [21]. For the crystal violet assay, Caco-2 cells were seeded at low density (10⁴ cells per well) in 96-well plates, grown for 20 h with the different treatments and incubated with crystal violet (0.2% in ethanol) for 20 min. Plates were rinsed with distilled water, allowed to dry, and 1% sodium dodecyl sulfate (SDS) added. The absorbance of each well was measured using a microplate reader at 570 nm (Bio-Tek, Winooski, VT, USA). For LDH assay, the culture medium and the cells scraped in PBS were collected after the different treatments. Cells were first sonicated to ensure breaking down the cell membrane to release the total amount of LDH; then, after centrifugation (1000 g, 15 min) to clear up the cell sample, 10 μ L were placed into a well of a 96 multiwell for the assay. In the same manner, 10 μ L of each culture medium were also deposited into a well of a 96-well multiwell. The LDH leakage percentage was estimated from the ratio between the LDH activity in the culture medium and that of the whole cell content.

2.5. Apoptosis

Apoptosis was evaluated as activation of Caspase-3 [22]. Cells were lysed in a buffer containing 5 mM Tris (pH 8), 20 mM EDTA, and 0.5% Triton X-100. The reaction mixture contained 20 mM HEPES (pH 7), 10% glycerol, 2 mM dithiothreitol (DTT), and 30 μ g of protein per condition, and 20 μ M Ac-DEVDAMC (N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-methylcoumarin) as substrate. Enzymatic activity was determined by measuring fluorescence at an excitation wavelength of 380 nm and an emission wavelength of 440 nm (Bio-Tek, Winooski, VT, USA).

2.6. ROS generation

Cellular ROS were quantified by the 2',7'-dichlorofluorescein (DCFH) assay using a microplate reader. For the assay, cells were plated in 24-well multiwells at a rate of 2×10⁵ cells per well and changed to FBS-free medium and the different treatments the day before the assay. After that, 5 μ M DCFH was added to the wells for 30 min at 37°C. Then, cells were washed twice with PBS and 0.5 ml of serum-free medium or serum-free medium with AA were added per well. After being oxidized by intracellular oxidants, DCFH will become dichlorofluorescein and emit fluorescence. ROS generation was evaluated at different times in a fluorescent microplate reader at an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 530 nm (Bio-Tek, Winooski, VT, USA).

2.7. Determination of reduced GSH

The content of GSH was quantified by the fluorometric assay of Hissin and Hilf [23]. The method takes advantage of the reaction of GSH with OPT at pH 8.0. After the different treatments, the culture medium was removed and cells were detached and homogenized by ultrasound with 5% trichloroacetic acid containing 2 mM EDTA. Following centrifugation of cells for 30 min at 3000 rpm, 50 μ L of the clear supernatant were transferred to a 96 multiwell plate for the assay. Fluorescence was measured at an excitation wavelength of 340 nm and an emission wavelength of 460 nm. The results of the samples were referred to those of a standard curve of GSH. The precise protocol has been described elsewhere [21].

2.8. Preparation of cell lysates for Western blotting

To detect the levels of γ -GCS, GST, ERKs, p-ERKs, JNKs and p-JNKs, cells were lysed at 4°C in a buffer containing 25 mM HEPES (pH 7.5), 0.3 M NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.1% Triton X-100, 200 mM β -glycerolphosphate, 0.1 mM Na₃VO₄, 21 g/ml leupeptin, and 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride. The supernatants were collected, assayed for protein concentration by using the Bradford reagents, aliquoted and stored at -80°C until used for Western blot analyses.

2.9. Protein determination by Western Blotting

Equal amounts of protein (100 μ g) were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to polyvinylidene difluoride filters (Protein Sequencing Membrane, Millipore). Membranes were probed with the corresponding primary antibody followed by incubation with peroxide-conjugated antirabbit Ig (GE Healthcare, Madrid, Spain) or peroxide-conjugated antimouse IgG (Sigma, Madrid, Spain) for GST antibody. Blots were developed with the ECL system (GE Healthcare). Normalization of Western blot was ensured by β -actin and bands were quantified by laser scanning densitometry (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA).

2.10. Statistics

Statistical analysis of data was as follows: prior to analysis the data were tested for homogeneity of variances by the test of Levene; for multiple comparisons, one-way analysis of variance was followed by a Bonferroni test when variances were homogeneous or by the Tamhane test when variances were not homogeneous. The level of significance was $P < 0.05$. A SPSS version 17.0 program has been used.

3. Results

3.1. Effect of AA on cell viability and apoptosis in Caco2 cells

In order to identify the doses at which cell toxicity was induced by AA, Caco-2 cells were exposed during 16 h at different concentrations of AA (1–20 mM). As shown in Fig. 1A, cell viability, as determined by the crystal violet assay, was significantly decreased in the presence of 5–20 mM AA. Comparable results were obtained when cytotoxicity was evaluated by the LDH leakage; AA induced a dose-dependent increase in toxicity (Fig. 1B). Additionally, time course experiments reveals that lower concentrations of AA (<5 mM) decreased cell viability of Caco-2 cells but for a longer exposure times (>36 h) (data not shown).

To further determine whether the cytotoxic effect was to some extent due to apoptosis, Caco-2 cells were exposed to 1–20 mM of AA

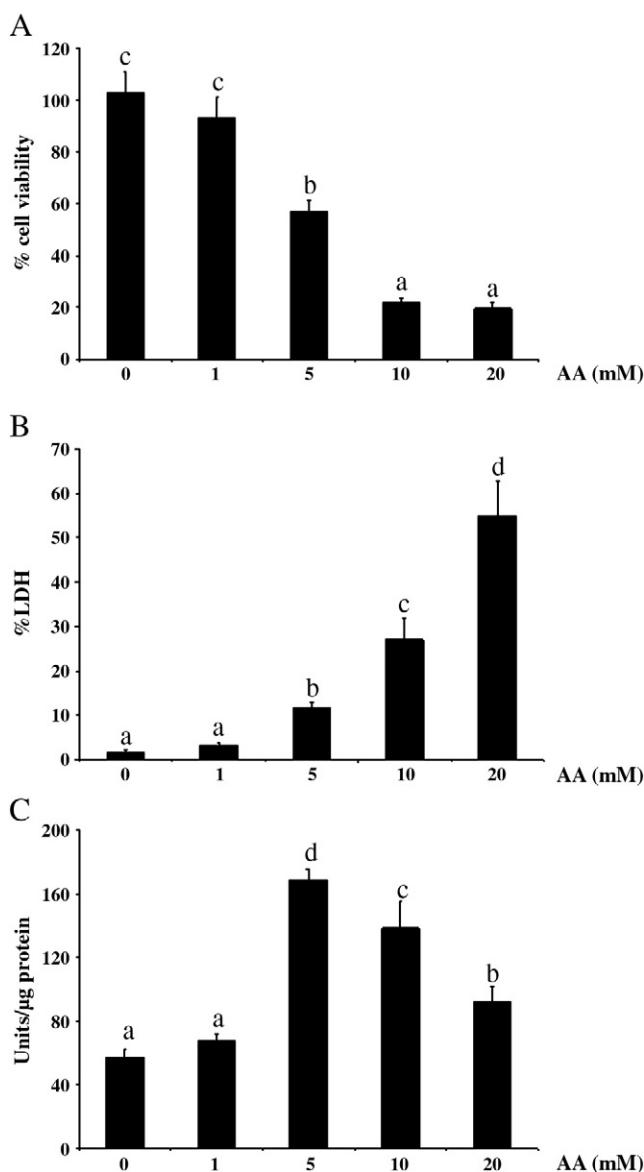


Fig. 1. Effect of AA on cell viability and caspase-3 activity. Caco-2 cells were treated during 16 h with the noted concentrations of AA and cell viability was determined as relative percentage of viable cells (A) and as LDH leakage (B). Caco-2 cells were incubated during 8 h with increasing concentrations of 1–20 mM AA and caspase-3 activity was assayed (C). Data represent means±S.D. of 10–12 samples per condition. Different letters denote statistically significant differences, $P<0.05$.

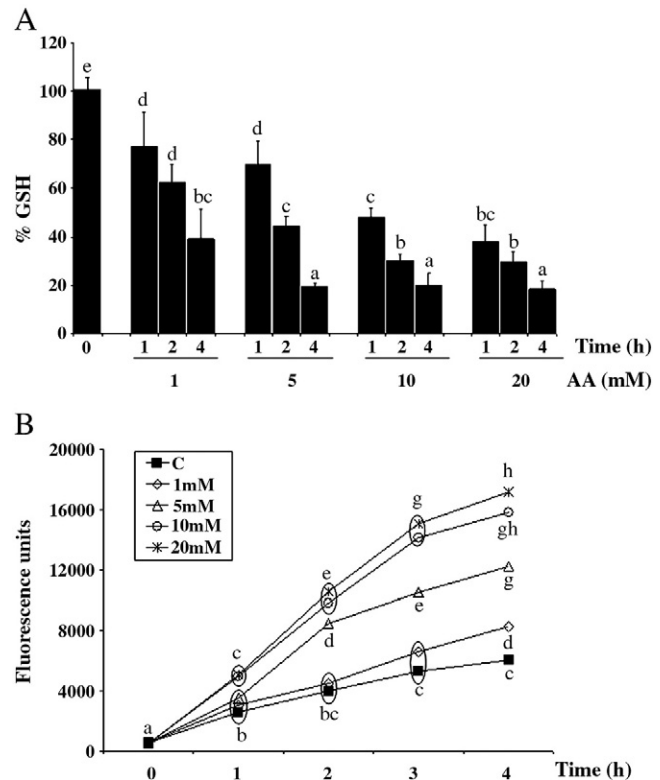


Fig. 2. Effect of AA on GSH levels and ROS generation. Caco-2 cells were treated with the indicated concentrations of AA and GSH levels were determined at 1, 2 and 4 h of incubation (A). Caco-2 cells were treated with the noted concentrations of AA and intracellular ROS production was evaluated at 0, 1, 2, 3 and 4 h (B). Values are means±SD of 10–12 different samples per condition. Different letters denote statistically significant differences, $P<0.05$.

for 8 h and caspase-3 activity was analyzed as a biomarker of apoptosis. As shown in Fig. 1C, the presence of 5–20 mM AA induced the activation of caspase-3, which reached an activation peak at the dose of 5 mM at this time. Similarly to what was found in cell viability, time-course experiments showed that doses of 10 and 20 mM AA achieved the highest caspase-3 activation at shorter exposure time (<8 h) while 1 mM AA significantly increased caspase-3 activity but for exposures longer than 24 h (data not shown). Altogether, these results indicate that AA is able to activate caspase-3 and thus to induce apoptosis and cell death in Caco-2 cells.

3.2. AA decreases GSH levels and induces ROS generation in Caco2 cells

Since cell death by apoptosis can be considered the final event of a redox imbalance, we next elucidated the redox status of Caco-2 cells evaluating GSH levels and ROS generation after AA treatment (0–4 h). Fig. 2A showed that GSH content rapidly decreased during incubation with 1–20 mM AA. Significant decreases were observed as early as 1 h, and GSH levels in the presence of 5–20 mM AA were less than 50% and 20% of control after 2 and 4 h, respectively. The decrease in GSH levels occurred in AA concentration- and time-dependent manner. Accordingly, 5–20 mM AA caused a significant increase in ROS production after 2 h of exposure (Fig. 2B), showing a two fold increase at 5 mM and a three fold at 20 mM. Conversely, ROS generation in the presence of 1 mM AA was significantly increased only after 4 h of treatment. These results show that AA induces a redox imbalance in Caco-2 cells by decreasing GSH levels and increasing ROS generation.

Given that 5 mM of AA was the smallest concentration that provoked cytotoxicity at the shortest time and induced GSH

depletion, ROS generation and activation of caspase-3, it was the concentration selected for the following experiments.

3.3. AA activates ERKs and JNKs in Caco-2 cells

Since oxidative stress is known to activate members of the MAPK family involved in the regulation of apoptosis, we next investigated the effect of AA on the expression and activities of two important constituents of this signalling cascade, the ERKs and JNKs kinases. Total and phosphorylated (active form) levels of ERKs and JNKs were evaluated by Western blotting at different times (0–16 h) of AA exposure. As shown in Fig. 3, the levels of p-ERKs increased at 2 h of AA-treatment reaching a peak at 4 h before decreasing at a longer incubation time. Conversely, phosphorylation of JNKs was only evident after 4 h of treatment and remained active until 16 h. Total ERKs and JNKs protein levels did not change during AA exposure. These results indicate that AA-induced apoptosis and cytotoxicity in Caco-2 cells is accompanied by an early and transient increase of p-ERKs and a sustained increase of p-JNKs.

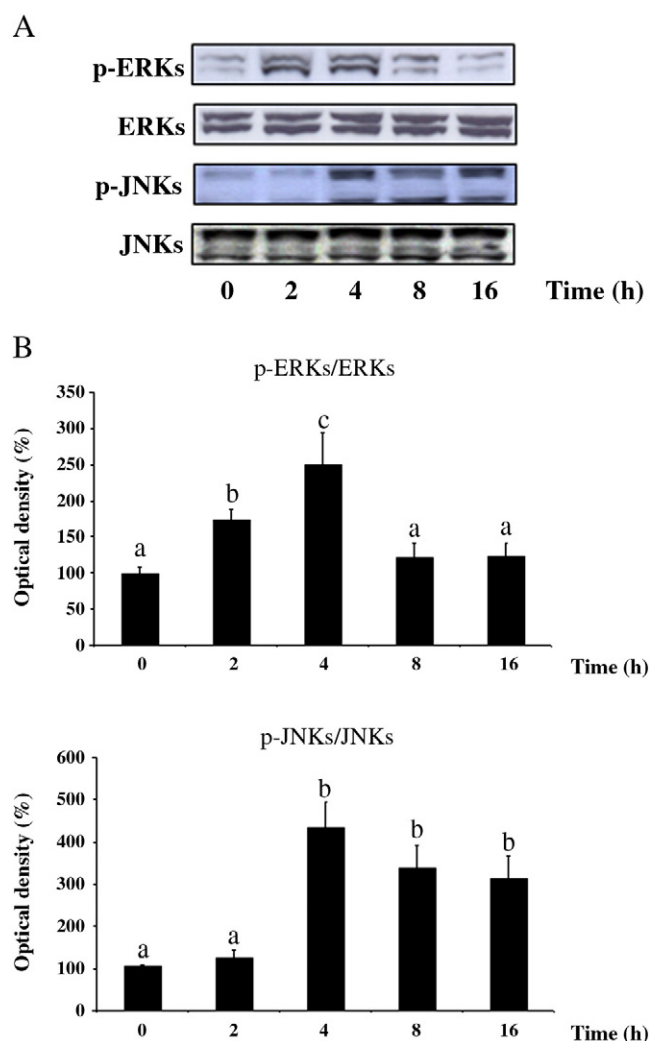


Fig. 3. Effect of AA on total and phosphorylated levels of ERKs and JNKs. Caco-2 cells exposed to 5 mM AA for the indicated times were subjected to Western blot analysis using total and phospho-specific antibodies to ERKs or JNKs. Representative Western blot (A) and percentage values (B) of p-ERKs/ERKs and p-JNKs/JNKs relative to the control conditions of three different experiments (means±S.D.). Means without a common letter differ, $P<0.05$.

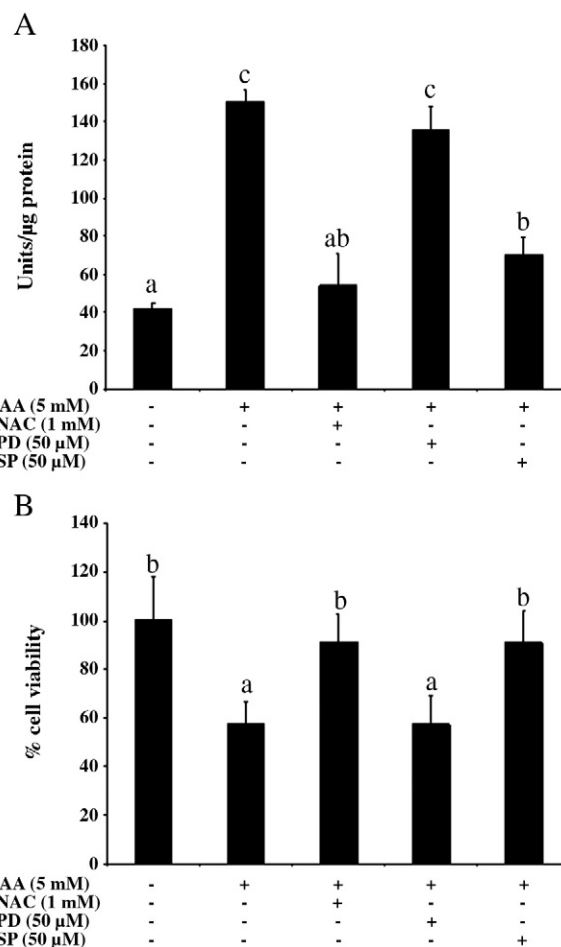


Fig. 4. Effect of NAC and selective inhibitors PD98059 (PD) and SP600125 (SP) on caspase-3 activation and cell death induced by AA. Caco-2 cells were pre-treated with 1 mM NAC or 50 μM PD or 50 μM SP. Then, cells were further exposed to 5 mM AA in the presence of NAC, PD and SP, and caspase-3 activity (A) and cell viability (B) were determined at 8 and 16 h, respectively. Data represent means±S.D. of 10 separate experiments. Different letters denote statistically significant differences, $P<0.05$.

3.4. Oxidative stress and JNKs activation are implicated on apoptosis and cytotoxicity induced by AA

Next, we aimed to elucidate whether AA-induced apoptosis and cell cytotoxicity could be associated with the altered cellular redox status and/or ERKs and JNKs activation observed in AA-treated cells. To this end, we examined the effect of the strong antioxidant NAC (a GSH synthesis precursor and ROS scavenger) and of the pharmacological ERKs and JNKs inhibitors, PD98059 (PD) and SP600125 (SP) respectively, on the caspase-3 activation and cell death induced by AA in Caco-2 cells. Thus, cells were pretreated during 1 h with 1 mM of NAC or 50 μM PD or 50 μM SP before the AA treatment during 8 h for caspase-3 assays and 16 h for cell viability determination. As shown in Fig. 4A, the AA-induced caspase-3 activity was significantly decreased by pre-treatment of Caco-2 cells with SP and NAC but not with PD. Similarly, the inhibition of JNKs or the presence of NAC, but not the inhibition of ERKs, resulted in the suppression of AA-induced Caco-2 cell death (Fig. 4B). Additionally, treatment with NAC or inhibitors alone for 24 h had no significant effects on the viability of cells compared to the untreated group (data not shown). Consequently, these results indicate that both oxidative stress and activation of JNKs seem to play a role in the signal transduction leading to apoptosis and cell death induced by AA in Caco-2 cells.

3.5. Effect of EC, PB2 and CPE on apoptosis and cytotoxicity induced by AA

Since dietary flavonoids have shown to function as powerful antioxidants, we next examined the ability of a well-standardized CPE and its main polyphenol components EC and PB2 to protect against AA-induced apoptosis and cytotoxicity. The working concentrations of the polyphenols were fixed at 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for the CPE and 10 μM for EC and PB2, which represent realistic concentrations in the human gut. To assess whether treatment with dietary polyphenols repressed the cytotoxic effect induced by AA, Caco-2 cells were treated for 20 h with EC, PB2 or CPE, and after removing polyphenol-containing culture medium, cells were further exposed to 5 mM AA; then, activation of caspase-3 and cell death were evaluated at 8 h and 16 h, respectively. Fig. 5A shows that treatment of cells with EC, PB2 or CPE significantly decreased the AA-increased caspase-3 activity reaching control values in the case of PB2 and CPE. Similarly, EC, PB2 and CPE significantly protected against AA-induced cell death induced by AA (Fig. 5B) although this protection was lower with EC. Altogether, these results seem to indicate that treatment of Caco-2 cells with PB2 or CPE totally protects against AA-induced apoptosis and cell death while treatment with EC exerted a slight protective action.

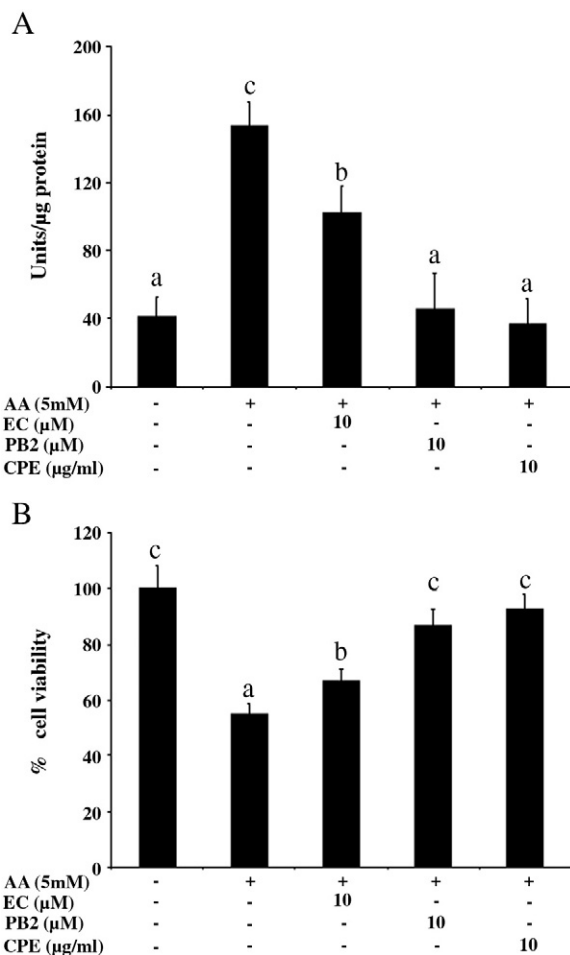


Fig. 5. Protective effect of EC, PB2 and CPE on caspase-3 activation and cell death induced by AA. Caco-2 cells were incubated with 10 μM of EC and PB2 and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of CPE for 20 h. Control and polyphenol-treated cells were further exposed to 5 mM AA, after removing polyphenol-containing culture medium, and caspase-3 activity (A) and cell viability (B) were determined at 8 and 16 h, respectively. Data represent means \pm S.D. of 10 separate experiments. Different letters denote statistically significant differences, $P < 0.05$.

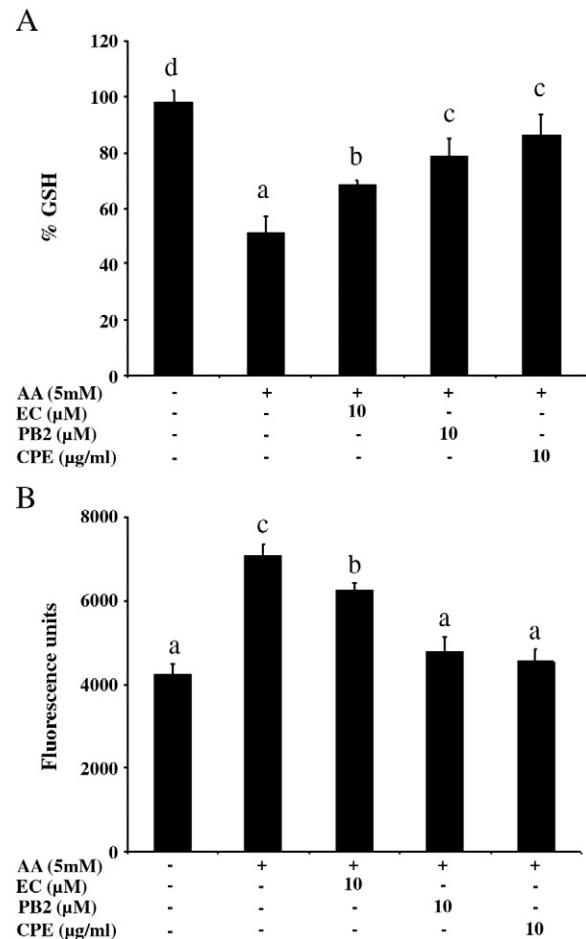


Fig. 6. Effect of EC, PB2 and CPE on the decreased GSH levels and increased ROS generation induced by AA. Caco-2 cells were treated with 10 μM of EC and PB2 and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of CPE for 20 h and further exposed to 5 mM AA. GSH levels (A) and ROS generation (B) were determined in control and polyphenol-treated cells after 2 and 4 h of AA treatment, respectively. Data represent means \pm S.D. of 10–12 samples per condition. Different letters denote statistically significant differences, $P < 0.05$.

3.6. Effect of EC, PB2 and CPE treatment on GSH depletion and ROS formation induced by AA

To better understand the mechanisms by which cocoa polyphenols protects against AA-induced apoptosis and cytotoxicity, we next evaluated the effect of the pretreatment of Caco-2 cells with EC, PB2 and CPE on the redox status induced by AA. Caco-2 cells were pre-treated during 20 h with 10 μM of EC or PB2 or with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of CPE before the 5 mM AA treatment. As shown in Fig. 6A, pre-treatment of Caco-2 cells with cocoa polyphenols significantly prevented the depletion of GSH induced by 2 h of 5 mM AA. Similarly, ROS production at 4 h was significantly decreased in cells pre-treated with EC, PB2 or CPE as compared to AA-treated cells (Fig. 6B). In fact, PB2- and CPE-treated cells showed levels similar to those of control cells. These results indicate that treatment with cocoa polyphenols prevented GSH depletion and ROS generation induced by AA. Interestingly, once again, this prevention was higher with PB2 and CPE than with EC.

3.7. PB2 and CPE treatment increases the GST and γ -GCS protein levels

The induction of antioxidant/detoxification enzymes has been suggested to be a further mechanism of polyphenols to improve the

intracellular defences and protect against oxidative stress insults. Therefore, we next evaluated the effect of AA treatment in control and EC-, PB2- and CPE-treated cells on the rate-limiting enzyme in GSH synthesis, γ -GCS and the detoxification enzyme GST. Likewise, we also determined the effect of EC, PB2 and CPE pretreatment on the levels of both enzymes. To this end, Caco-2 cells were pretreated during 20 h with 10 μ M of EC or PB2 or with 10 μ g/ml of CPE. After that, control and polyphenol-treated cells were exposed to 5 mM AA and the levels of γ -GCS and GST were evaluated by Western blotting at different times (0–16 h). As shown in Fig. 7, the protein levels of both enzymes significantly decreased after 4 h of AA treatment and continuously decreased until 16 h in control cells. EC treatment did not affect γ -GCS and GST basal levels but avoided the decrease on γ -GCS levels and delayed until 8 h the decrease on GST levels induced by AA. On the other hand, γ -GCS and GST levels were increased in PB2- and CPE-treated cells before the AA treatment as compared with control cells and, interestingly, they remained increased in the presence of AA. These results indicate that treatment of Caco-2 cells with PB2 and CPE increased the cellular levels of γ -GCS and GST and avoided the decrease in both enzymes induced by AA.

3.8. PB2 and CPE treatment prevent the phosphorylation of JNKs induced by AA

Finally, to verify that the improved redox status induced by PB2 and CPE in Caco-2 cells was correlated with the prevention of apoptotic signalling induced by AA, we investigated the effect of the treatment with cocoa polyphenols in the signalling pathways activated by AA. To this end, Caco-2 cells treated during 20 h with EC, PB2 and CPE were further exposed to 5 mM of AA for different times (0–16 h) and then immunoblots were performed using phospho- and non-phosphoantibodies against ERKs and JNKs. Fig. 8A shows that before AA treatment the p-ERK levels were increased in EC-treated cells although they returned to control levels after 8 h of AA treatment. In addition, similar to what was found in control cells treated with AA (Fig. 3), the EC-treated cells showed an increase in p-JNKs levels after 4 h of AA treatment and remained active until 16 h. On the other hand, PB2- and CPE-treated cells also showed an increase in p-ERKs levels before the AA treatment but in this case, the ERK activation continued in the presence of AA for the length of the experiment. In addition, contrary to control and EC-treated cells, there were no changes in p-JNKs levels in PB2- and CPE-treated cells in the

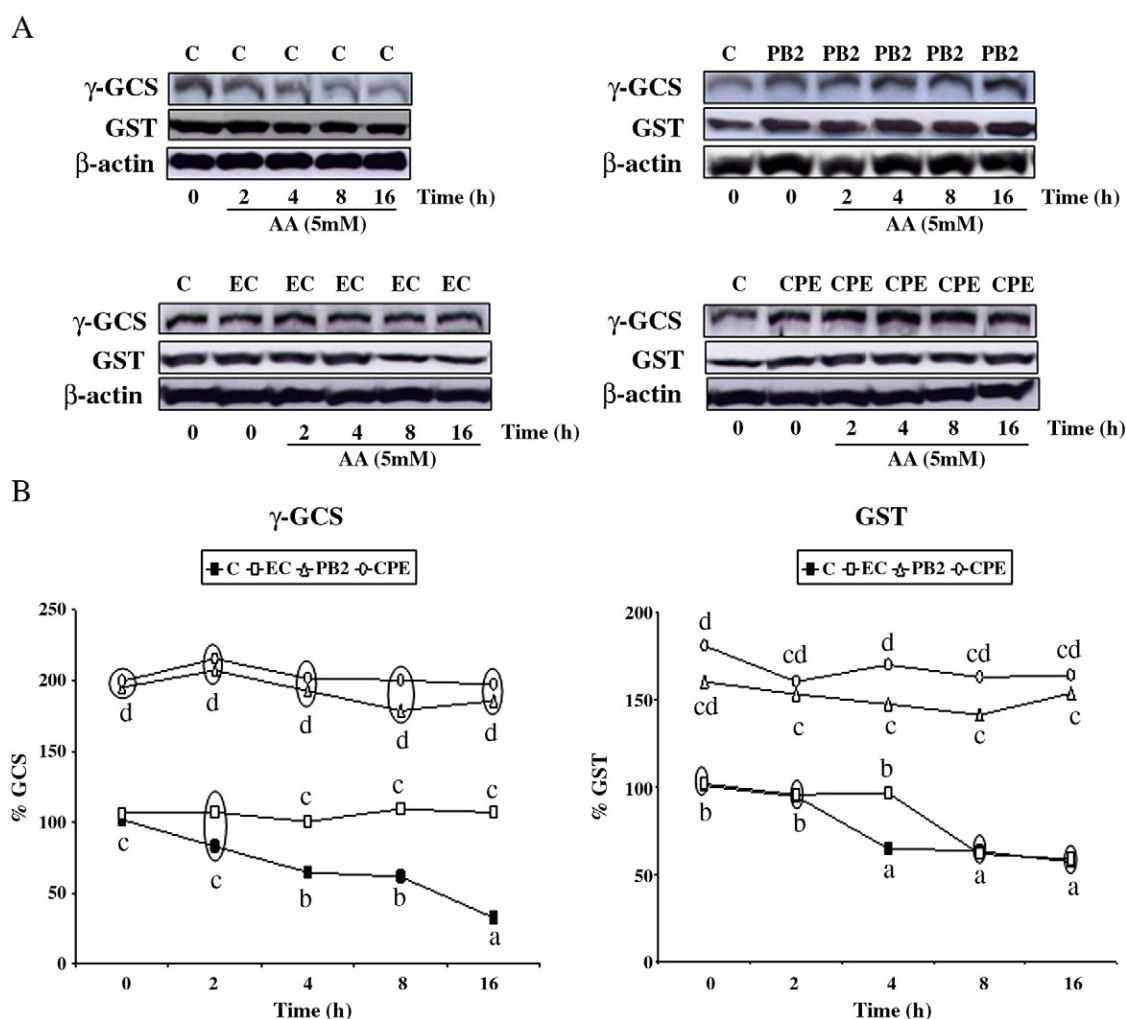


Fig. 7. Effect of EC, PB2 and CPE on GST and γ -GCS protein levels. Caco-2 cells were incubated with 10 μ M of EC and PB2 and 10 μ g/ml of CPE for 20 h. Control and EC- PB2- and CPE-treated cells were further exposed to 5 mM AA for the indicated times and subjected to Western blot analysis using specific antibodies to γ -GCS and GST. Representative Western blot (A) and percentage values of γ -GCS and GST (B) of three different experiments relative to the control conditions at time 0 (means \pm S.D.). Normalization of Western blots was ensured by β -actin. Means without a common letter differ, $P < 0.05$.

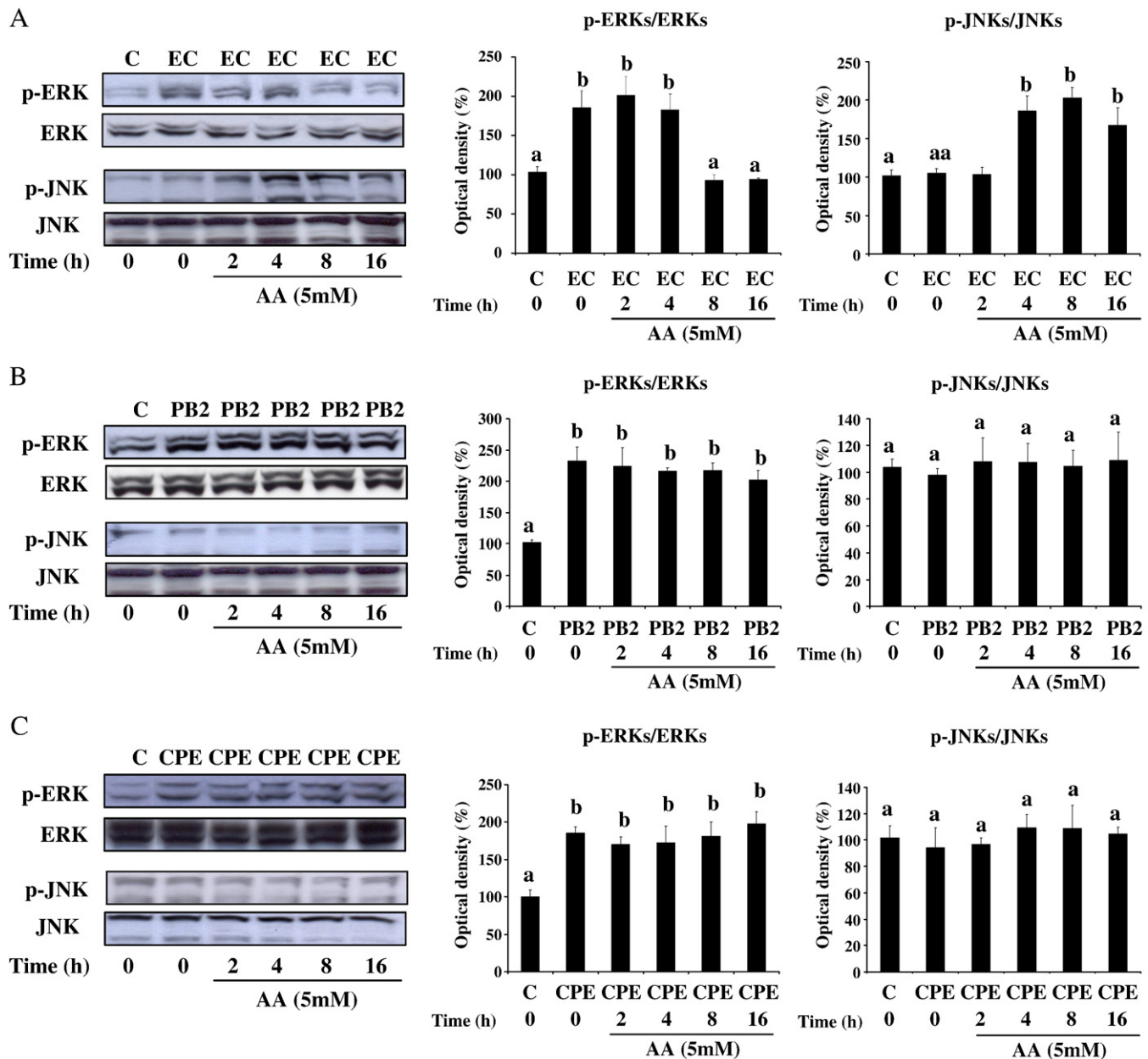


Fig. 8. Effect of EC, PB2 and CPE on total and phosphorylated levels of ERKs and JNKs. Caco-2 cells were incubated with 10 μ M of EC and PB2 and 10 μ g/ml of CPE for 20 h. Control and polyphenol-treated cells were further exposed to 5 mM AA for the indicated times and subjected to Western blot analysis using total and phospho specific antibodies to ERKs or JNKs. Representative Western blot and percentage values of p-ERKs/ERKs and p-JNKs/JNKs of three different experiments relative to the control conditions (means \pm S.D.) in EC- (A), PB2- (B) and CPE-treated cells (C). Normalization of Western blots was ensured by β -actin. Means without a common letter differ, $P < .05$.

presence of AA (Fig. 8B and C). Likewise, there was no difference in the total levels of ERKs or JNKs in any treatment.

Altogether, these results indicate that EC, PB2 and CPE treatment activate the ERK pathway and continued increased in the presence of AA only in PB2- and CPE-treated cells. Similarly, PB2 and CPE treatment also prevented the increase of p-JNKs levels induced by AA.

4. Discussion

It has been recently shown in humans that regular consumption of products containing AA increases the production of reactive oxygen radicals in leukocytes and induces a generalized pro-inflammatory state [4]. These observations, together with the evidences of AA-induced apoptosis both in animals [24,25] and in cell cultures [26,27], suggest a relationship between oxidative stress and cell damage in the

presence of this toxic. To our knowledge, the present study is the first to show that AA-induced oxidative stress leads to apoptosis and cytotoxicity in human intestinal Caco-2 cells. This is important since ingested AA is rapidly absorbed to a high degree in the human intestine [11], and therefore, studies assessing AA influence on gastrointestinal cells integrity seem necessary. Interestingly, we also demonstrate that physiological concentrations of dietary antioxidant compounds like procyanidin B2 and a mixture of cocoa polyphenols were able to counteract the deleterious effect of AA. Thus, an increased intake of these natural antioxidants could be relevant to mitigate AA-associated risks related to oxidative stress.

GSH is the most abundant cellular antioxidant responsible for the maintenance of the cellular redox state. Consequently, GSH depletion induced by AA may contribute to the creation of oxidative stress conditions as previously demonstrated in HepG2 cells [7] and in

human-derived monocytes-macrophages in vitro [4]. Our results show that treatment of Caco-2 cells with AA led to a significant depletion of GSH and overproduction of ROS and, consequently, to an increase in oxidative stress. In addition, we found that redox disturbance precedes activation of caspase-3, considered a very specific and sensitive apoptotic marker [28], suggesting a temporal link between GSH depletion, ROS overproduction and apoptotic cell death induced by AA in Caco-2 cells. This association was confirmed by the fact that pretreatment with NAC, a potent GSH precursor, abolishes apoptosis and cytotoxicity generated by AA. Therefore, as previously shown in Caco-2 cells [13,14] and in other cell types [29,30], the loss of cellular GSH redox status seems to be an important player in apoptotic signalling.

AA-induced apoptosis has already been demonstrated in the rat nervous system [24] as well as in neuroblastoma [26] and astrocytoma [27] cells. However, the modes of action underlying this effect have not been clearly defined. One of the potential mechanisms involved could be the activation of signalling pathways implicated in the apoptotic process. In this regard, numerous investigations have pointed out the importance of the MAPK pathway in the regulation of stress-dependent apoptosis [10]. In addition, ROS overproduction activates JNK- and ERK-MAPKs to induce apoptotic reactions in oxidative stress-induced intestinal epithelial cell injury [31]. Interestingly, we found that following ROS generation, AA caused a rapid but transient activation of ERKs and a persistent activation of JNKs in Caco-2 cells. In general, activation of ERKs seems to favour survival signals, while sustained JNKs activation results in apoptosis [10]. Supporting this, in this work, specific JNKs but not ERKs inhibitors prevented the subsequent increase in caspase-3 activity and cell death induced by AA, indicating that JNKs activation participated in the mechanism of AA induced apoptosis. Further support for this hypothesis is provided by previous findings of induction of JNKs contributing to the differentiation and apoptotic pathways in Caco-2 cells [32]. Moreover, enhanced expression and activation of JNKs has also been related with intestinal inflammatory conditions [33,34]; thus, these results indicate that AA ingestion may constitute a dietary risk factor for intestine injury.

Several natural products have been shown to protect cells against oxidative damage by virtue of their antioxidant properties [35]. Among them, cocoa flavonoids and their metabolites have demonstrated to possess antioxidant capacity and to protect against an oxidative insult [36]. Indeed, polyphenols and especially PB2 are poorly absorbed in the intestine so its beneficial effects would be restricted to the gastrointestinal tract where they may have an important local function neutralising oxidants [36]. For example, cocoa procyanidins have been recently reported to protect intestinal Caco-2 cell from the loss of integrity induced by a lipophilic oxidant [37]. In addition, high cocoa intake has also been shown to modulate intestinal and systemic immune cell functionality in vivo [38]. Accordingly, the present study shows that a complex mixture of cocoa polyphenols and the pure flavanols PB2 and EC effectively suppressed the increase in caspase-3 activity and the cell death induced by AA in Caco-2 cells.

An interesting observation in the present study is the finding that the protective effect of CPE and PB2 against AA cytotoxicity was higher than that of EC. Furthermore, both CPE and PB2 almost completely blocked the decrease of GSH induced by AA and totally abrogated the subsequently increased ROS generation while these effects were only partially restored with EC. This result suggests that the minor effect exerted by EC could be partially ascribed to the fact that EC mainly acted as scavenger of free radicals. However, similar to what was reported for other polyphenols and antioxidants [39], PB2 and CPE could protect cell constituents not only by neutralising several types of radicals but also by up-regulating antioxidant defences as well as interacting with signalling pathways involved in cell survival.

To further corroborate this latter hypothesis, we evaluated the effect of cocoa polyphenols and AA in the protein levels of γ -GCS and GST enzymes. γ -GCS catalyses the first and rate limiting step in GSH synthesis while GST is involved in the detoxification of xenobiotics. Both GST and GSH inducers could be potential inhibitors of AA cytotoxicity. According to that, we found that PB2 and CPE but not EC increased the basal levels of γ -GCS and GST and significantly prevented the AA-induced decrease in both enzymes. Therefore, these results support the important role of the induction of cytoprotective enzymes exhibited by some polyphenols as an additional mechanism of action to better defend against AA insult. Similar results have been recently shown with phenolic compounds increasing glutathione related enzymes in intestine to protect against oxidative stress induced by lipid peroxidation [40].

Consistent with the above observations, AA-induced activation of JNKs was also blocked by PB2 and CPE treatment but not by EC. Interestingly, there is a relationship between elevated GST expression and resistance to apoptosis indicating the critical role that GST plays in modulating JNK signalling pathways [41]. In this line, our results agree with other studies in which increased GST expression results in decreased JNK activity and protection from ROS-mediated cell death [41,42]. Furthermore, the increased activation of ERKs shown with all polyphenol probably plays an indirect protective role by these compounds through the promotion of cell proliferation and survival signalling. Therefore, we suggest that the modulation of GSH levels through the fortifying of cellular defences along with the induction of survival pathways by PB2 and CPE inhibit the AA-induced intracellular signals leading to apoptosis and results in cell survival. All together, these results confirm the antiapoptotic effect of these dietary compounds as a further mechanism of action.

It is worth noting that the concentrations of AA applied to the cell cultures in the present study were to some extent high; however, other authors [4] and initial studies in our laboratory have showed that smaller doses of AA can act as toxicant because similar effects could be observed under long-term exposure. For methodological reasons, the actual conditions of cell culture favoured to increase the dose and reduce the exposure time and this has to be taken into consideration when further discussing the consequences for the dietary intake of AA-containing food. On the other hand, we cannot rule out that daily exposure to a lower dose of AA may bring about a risk factor of toxicity in human. Therefore, efforts designed both to reduce the AA content of processed foods and to mitigate adverse manifestation of AA after consumption are necessary.

In summary, our present study provides evidence that redox perturbation induced by AA leads to activation of JNKs, increased caspase-3 activity and enhanced apoptosis and cytotoxicity in Caco-2 cells. Interestingly, AA cytotoxicity was fully counteracted by dietary phenols such as CPE or PB2 which prevented GSH depletion and ROS overproduction and blocked the apoptotic pathways activated by AA. Furthermore, both compounds exhibited antioxidant properties by modulating the levels of cytoprotective enzymes such as γ -GCS and GST and antiapoptotic effects by influencing signalling pathways implicated in apoptosis and survival. All together, these results strongly support the role of the redox status in AA-mediated apoptosis and the potential contribution of this process to the genesis of gut pathology. In addition, they underline the important role of dietary antioxidants like cocoa polyphenols for nutritional prevention of certain pathological and physiological states linked to oxidative stress.

References

- [1] Tareke E, Rydberg P, Karlsson P, Eriksson M, Tornqvist M. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated food-stuffs. *J Agric Food Chem* 2002;50:4998–5006.
- [2] Parzefal W. Minireview on the toxicity of dietary acrylamide. *Food Chem Toxicol* 2008;46:1360–4.

- [3] Park H, Kim MS, Kim SJ, Park M, Kong KH, Kim HS, et al. Acrylamide induces cell death in neural progenitor cells and impairs hippocampal neurogenesis. *Toxicol Lett* 2010;193:86–93.
- [4] Naruszewicz M, Zapolska-Downar D, Kosmider A, Nowicka G, Kozłowska-Wojciechowska M, Vikstrom AS, et al. Chronic intake of potato chips in humans increases the production of reactive oxygen radicals by leukocytes and increases plasma C-reactive protein: a pilot study. *Am J Clin Nutr* 2009;89:773–7.
- [5] Zhang X, Cao J, Jiang L, Geng Ch, Zhong L. Protective effect of hydroxytyrosol against acrylamide-induced cytotoxicity and DNA damage in HepG2 cells. *Mutat Res* 2009;664:64–8.
- [6] Yousef MI, El-Demerdash FM. Acrylamide-induced oxidative stress and biochemical perturbations in rats. *Toxicology* 2006;219:133–41.
- [7] Cao J, Liu Y, Jia L, Jiang LP, Geng Ch, Yao XF, et al. Curcumin attenuates acrylamide-induced cytotoxicity and genotoxicity in HepG2 cells by ROS scavenging. *J Agric Food Chem* 2008;56:12059–63.
- [8] Pernice R, Hauder J, Koehler P, Vitaglione P, Fogliano V, Somoza V. Effect of sulforaphane on glutathione-adduct formation and on glutathione S transferase-dependent detoxification of acrylamide in Caco-2 cells. *Molec Nutr Food Res* 2009;53:1540–50.
- [9] Zhu YJ, Zeng T, Zhu YB, Yu SF, Wang QS, Zhang LP, et al. Effects of acrylamide on the nervous tissue antioxidant system and sciatic nerve electrophysiology in the rat. *Neurochem Res* 2008;33:2310–7.
- [10] Valko M, Leibfriz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39:44–84.
- [11] Zödl B, Schmid D, Wassler G, Gundacker C, Leibetseder V, Thalhammer T, et al. Intestinal transport and metabolism of acrylamide. *Toxicology* 2007;232:99–108.
- [12] Lash LH. Mitochondrial glutathione transport: physiological, pathological and toxicological implications. *Chem Biol Interact* 2006;163:54–67.
- [13] Circu ML, Rodríguez C, Maloney R, Moyer MP, Aw TY. Contribution of mitochondrial GSH transport to matrix GSH status and colonic epithelial cell apoptosis. *Free Radical Bio Med* 2008;44:768–78.
- [14] Wang TG, Gotoh Y, Jennings MH, Rhoads CA, Aw TY. Lipid hydroperoxide-induced apoptosis in human colonic Caco-2 cells is associated with an early loss of cellular redox balance. *FASEB J* 2000;14:1567–76.
- [15] Lamuela-Raventós RM, Romero-Pérez AI, Andrés-Lacueva C, Tórnado A. Health Effects of Cocoa Flavonoids. *Food Sci Technol Int* 2005;11:159–76.
- [16] Vinson JA, Proch J, Bose P, Muchler S, Taffera P, Shutta D, et al. Chocolate is a powerful ex vivo and in vitro antioxidant, antiatherosclerotic agent in an animal model, and a significant contributor to antioxidants in the European and American diets. *J Agric Food Chem* 2006;54:8071–6.
- [17] Martín MA, Ramos S, Mateos R, Granado-Serrano AB, Izquierdo-Pulido M, Bravo L, et al. Protection of human HepG2 cells against oxidative stress by cocoa phenolic extract. *J Agric Food Chem* 2008;56:7765–72.
- [18] Martín MA, Granado-Serrano AB, Ramos S, Izquierdo-Pulido M, Bravo L, Goya L. Cocoa flavonoids up-regulate antioxidant enzyme activity via the ERK1/2 pathway to protect against oxidative stress-induced apoptosis in HepG2 cells. *J Nutr Biochem* 2010;21:196–205.
- [19] Granado-Serrano AB, Martín MA, Goya L, Bravo L, Ramos S. Time-course regulation of survival pathways by epicatechin on HepG2 cells. *J Nutr Biochem* 2009;20:115–24.
- [20] Granado-Serrano AB, Martín MA, Izquierdo-Pulido M, Goya L, Bravo L, Ramos S. Molecular mechanisms of (–)-epicatechin and chlorogenic acid on the regulation of the apoptotic and survival/proliferation pathways in a human hepatoma cell line. *J Agric Food Chem* 2007;55:2020–7.
- [21] Alía M, Ramos S, Mateos R, Granado-Serrano AB, Bravo L, Goya L. Quercetin protects human hepatoma cell line (HepG2) against oxidative stress induced by tertbutyl hydroperoxide. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006;212:110–8.
- [22] Granado-Serrano AB, Martín MA, Bravo L, Goya L, Ramos S. Quercetin induces apoptosis via caspase activation, regulation of Bcl-2, and inhibition of PI-3-kinase/Akt and ERK pathways in a human hepatoma cell line (HepG2). *J Nutr* 2006;136:2715–21.
- [23] Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidised and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem* 1976;74:214–26.
- [24] Li S, Cui N, Zhang C, Zhao S, Yu S, Xie K. Effect of subchronic exposure to acrylamide induced on the expression of bcl-2, bax and caspase-3 in the rat nervous system. *Toxicology* 2006;217:46–53.
- [25] Zhang X, Zhao C, Jie B. Various dietary polyunsaturated fatty acids modulate acrylamide-induced preneoplastic urothelial proliferation and apoptosis in mice. *Experimental Toxicol Pathol* 2010;62:9–16.
- [26] Sumizawa T, Igisu H. Apoptosis induced by acrylamide in SH-SY5Y cells. *Arch Toxicology* 2007;81:279–82.
- [27] Chen JH, Wub KY, Chiu IM, Tsou TC, Chou ChCh. Acrylamide-induced astroglial and apoptotic responses in human astrocytoma cells. *Toxicol in Vitro* 2009;23:855–61.
- [28] Gomez-Lechon MJ, O'Connor E, Castell JV, Jover R. Sensitive markers used to identify compounds that trigger apoptosis in cultured hepatocytes. *Toxicol Sci* 2002;65:299–308.
- [29] Esteve JM, Mompou J, de la Asuncion JA, Sastra J, Asensi M, Boix J, et al. Oxidative damage to mitochondrial DNA and glutathione oxidation in apoptosis: studies in vivo and in vitro. *FASEB J* 1999;13:1055–64.
- [30] Ekshyyan O, Aw TY. Decreased susceptibility of differentiated P12 cells to oxidative challenge: relationship to cellular redox and expression of apoptotic protease activator factor-1. *Cell Death Differ* 2005;12:1066–77.
- [31] Zhou Y, Wang O, Evers BM, Chung DH. Signal transduction pathways involved in oxidative stress-induced intestinal epithelial cell apoptosis. *Pediatr Res* 2005;58:1192–7.
- [32] Ding Q, Wang Q, Evers BM. Alterations of MAPK activities associated with intestinal cell differentiation. *Biochem Bioph Res Commun* 2001;284:282–8.
- [33] Zingarelli B, Yang Z, Hake PW, Denenberg A, Wong HR. Absence of endogenous interleukin-10 enhances early stress response during postischemic injury in mice intestine. *Gut* 2001;5:610–22.
- [34] Romier B, Schneider YJ, Larondelle Y, During A. Dietary polyphenols can modulate the intestinal inflammatory response. *Nutr Rev* 2009;67:363–78.
- [35] Virgili F, Marino M. Regulation of cellular signals from nutritional molecules: a specific role for phytochemicals, beyond antioxidant activity. *Free Radical Biol Med* 2008;45:1205–16.
- [36] Ramiro-Puig E, Castell M. Cocoa: antioxidant and immunomodulator. *Brit J Nutr* 2009;101:931–40.
- [37] Erlejtman AG, Fraga CG, Oteiza PI. Procyanidins protect Caco-2 cells from bile acid- and oxidant-induced damage. *Free Radic Biol Med* 2006;41:1247–56.
- [38] Ramiro-Puig E, Perez-Cano FJ, Ramos-Romero S, Pérez-Berezo T, Castellote C, Permanyer J, et al. Intestinal immune system of young rats influenced by cocoa enriched diet. *J Nutr Biochem* 2008;19:555–65.
- [39] Masella RT, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem* 2005;16:577–86.
- [40] Giovannini C, Scazzocchio B, Matarrese P, Varia R, D'Archivio M, Di Benedetto R, et al. Apoptosis induced by oxidized lipids is associated with up-regulation of p66Shc in intestinal Caco-2 cells: protective effects of phenolic compounds. *J Nutr Biochem* 2008;19:18–28.
- [41] Romero L, Andrews K, Ng L, O'Rourke K, Maslen A, Kirby G. Human GSTA1-1 reduces c-Jun N-terminal kinase signalling and apoptosis in Caco-2 cells. *Biochem J* 2006;400:135–41.
- [42] Yin Z, Ivanov VN, Habelhah H, Tew K, Ronai Z. Glutathione S-transferase elicits protection against H₂O₂-induced cell death via coordinated regulation of stress kinases. *Cancer Res* 2000;60:4053–7.

Capítulo 3

Estudio del potencial efecto protector de una dieta enriquecida en cacao frente al inicio del cáncer de colon en un modelo animal *in vivo*

Resumen

El cáncer de colon es una de las principales enfermedades en los países desarrollados, constituyendo la tercera causa más frecuente de muerte¹⁶². El cáncer es un proceso multiseccional generalmente definido por tres fases: iniciación, promoción y progresión. El estrés oxidativo, así como los procesos inflamatorios crónicos, son dos de las etiologías más frecuentemente implicadas en las fases de inicio y desarrollo del cáncer de colon^{116,163}. El estrés oxidativo puede participar durante cada una de las fases del cáncer dañando los lípidos, las proteínas y especialmente el ADN celular; además, puede alterar numerosas vías de señalización celular implicadas en la proliferación de células iniciadas, aumentando el desarrollo del proceso tumoral¹²⁰. Igualmente, un cuadro inflamatorio persistente en la mucosa intestinal, ocasionado por el desarrollo de una enfermedad crónica, también puede promover el inicio y la progresión de la formación de tumores¹²⁰.

Numerosos estudios epidemiológicos han sugerido que una dieta rica en antioxidantes naturales está asociada con una disminución del riesgo de padecer ciertas enfermedades, entre ellas el cáncer de colon¹⁶⁴. Este hecho ha acentuado el interés científico por investigar los efectos y los mecanismos de acción a través de los cuales los compuestos bioactivos de la dieta previenen el desarrollo de las fases más tempranas del cáncer. No obstante, a pesar del alto contenido de flavonoides presentes en el cacao, son pocos los estudios que han investigado sus efectos preventivos frente al inicio del cáncer de colon.

En este trabajo se estudiaron los efectos de una dieta enriquecida en cacao en la prevención del inicio del cáncer de colon inducido por AOM en animales de experimentación. Los resultados han puesto de manifiesto una reducción significativa en la formación y en la multiplicidad de los ACF (lesiones pre-neoplásicas) en los animales que fueron alimentados con la dieta enriquecida con cacao. Esta reducción en dichas lesiones ha sido atribuida a varios efectos y mecanismos de acción. Así, se encontró que los animales alimentados con la dieta rica en cacao mostraron una disminución del estrés oxidativo en la mucosa intestinal, limitando el daño a las macromoléculas celulares y aumentando las defensas antioxidantes. La dieta enriquecida en cacao, también disminuyó la proliferación celular al modular las vías de señales implicadas en este proceso, las ERKs, la AKT y la ciclina D1. De la misma forma, en los animales alimentados con la dieta rica en cacao se redujo el proceso inflamatorio al disminuirse la activación del factor de transcripción NF- κ B. Por último,

la dieta enriquecida en cacao indujo la apoptosis celular en las células dañadas de la mucosa, mediante la modulación de proteínas pro-apoptóticas (Bax) y anti-apoptóticas (Bcl-x_L) y la activación de las caspasa-3.

En conclusión, la dieta enriquecida en cacao previno la fase más temprana del cáncer de colon disminuyendo algunas de las patologías más comúnmente asociadas con el origen de esta enfermedad, como son el estrés oxidativo, la inflamación o la proliferación celular.

Artículo 4

Cocoa-rich diet prevents azoxymethane-induced colonic preneoplastic lesions in rats by restraining oxidative stress and cell proliferation and inducing apoptosis

Ildefonso Rodríguez-Ramiro · Sonia Ramos · Elvira López-Oliva · Ángel Agis-Torres · Miren Gómez-Juaristi · Raquel Mateos · Laura Bravo · Luis Goya ·

María Ángeles Martín

Molecular Nutrition & Food Research (2011)

Artículo 5

Cocoa polyphenols prevent inflammation in colon of azoxymethane-treated rats and in TNF- α -stimulated Caco-2 cells.

Ildefonso Rodríguez-Ramiro · Sonia Ramos · Elvira López-Oliva · Ángel Agis-Torres · Laura Bravo · Luis Goya · María Ángeles Martín

Submitted to British Journal of Nutrition

FOOD & FUNCTION

Cocoa-rich diet prevents azoxymethane-induced colonic preneoplastic lesions in rats by restraining oxidative stress and cell proliferation and inducing apoptosis

Ildefonso Rodríguez-Ramiro¹, Sonia Ramos¹, Elvira López-Oliva², Angel Agis-Torres², Miren Gómez-Juaristi¹, Raquel Mateos¹, Laura Bravo¹, Luis Goya¹ and María Ángeles Martín^{1,3}

¹Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC), Madrid, Spain

²Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

³CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), ISCIII, Madrid, Spain

Cocoa is a rich source of bioactive compounds with potential chemopreventive ability but up to date its effectiveness in animal models of colon carcinogenesis has not been addressed. Herein, we investigated the *in vivo* effect of a cocoa-rich diet in the prevention of azoxymethane (AOM)-induced colon cancer and the mechanisms involved. Our results showed that cocoa feeding significantly reduced AOM-induced colonic aberrant crypt foci formation and crypt multiplicity. Oxidative imbalance in colon tissues seems to be prevented by cocoa as indicated by reduced oxidation markers levels and increased enzymatic and non-enzymatic endogenous defences. Cocoa-rich diet also exhibited antiproliferative effects by decreasing the levels of extracellular regulated kinases, protein kinase B and cyclin D1 together with proapoptotic effects evidenced by reduced Bcl-x_L levels and increased Bax levels and caspase-3 activity. Our findings provide the first *in vivo* evidence that a cocoa-rich diet may inhibit the early stage of colon carcinogenesis probably by preventing oxidative stress and cell proliferation and by inducing apoptosis.

Received: May 30, 2011

Revised: July 8, 2011

Accepted: July 13, 2011



Keywords:

Bioactive compounds / Cocoa flavanols / Colorectal cancer / Glutathione enzymes / Oxidative stress

Numerous epidemiological studies suggest that diets rich in natural antioxidants are associated with reduced risk of certain cancers, notably colorectal cancer (CRC) [1]. Cancer is a multistage process conventionally defined by three stages: initiation, promotion and progression. Along this process, oxidative stress has the potential to affect a large array of carcinogenic pathways involved in proliferation of

initiated cells and enhanced malignant transformation [2]. Therefore, the suppression of oxidative stress by natural antioxidant compounds seems to be an effective approach in preventing the initiation and progression of CRC.

Cocoa and its phenolic compounds, the flavanols epicatechin, catechin and procyanidins, have recently attracted a great deal of interest because of their potential ability to act as highly effective chemopreventive agents. As antioxidants, cocoa flavanols have been shown to protect cell constituents, limiting the risk factor for cancer and other chronic diseases [3, 4]. In addition, they can display other chemopreventive properties which may be independent of conventional antioxidant activities [5]. In particular, the recent *in vitro* studies have demonstrated that cocoa phenolic compounds can regulate several signal transduction pathways [6, 7], activate redox-sensitive transcription factors [8] and modulate expression of specific genes involved in cell survival and cell

Correspondence: Dr. María Ángeles Martín, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC), José Antonio Novais 10, Ciudad Universitaria, 28040, Madrid, Spain

E-mail: amartina@ictan.csic.es

Fax: +34-91-549-36-27

Abbreviations: ACF, aberrant crypt foci; AOM, azoxymethane; CRC, colorectal cancer; GSH, glutathione; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling

death [9]. Moreover, as compared with other flavonoid-containing foods, cocoa products exhibit a high concentration of procyanidins that are poorly absorbed in the intestine and consequently its beneficial effects would be more focused on the gastrointestinal tract where they may have an important local function neutralising oxidants. Despite these evidences, the efficacy of cocoa against CRC initiation and development in vivo remains largely unexamined. Therefore, in the present study we have used the well-defined azoxymethane (AOM)-induced colon cancer model in rats to investigate the effectiveness of a cocoa-enriched diet in preventing the early phase of colon carcinogenesis and the mechanisms of action involved.

Natural Forastero cocoa powder (a kind gift from Nutrexpa, Barcelona, Spain) was used for this study. A detailed description of this cocoa is given elsewhere [10]. Diets were prepared from an AIN-93G formulation (Panlab S. L., Barcelona, Spain). The 12% cocoa diet was produced by adding 120 g/kg cocoa to AIN-93G. This powdered supplement was formulated to provide 1 g of polyphenols/kg of diet. A similar cocoa supplementation protected liver cells against oxidative stress by activating the antioxidant defence system [11]. The composition of the diets is given in Supporting Information Table 1. Rats were fed with control or cocoa-enriched diets during 8 wk and injected with saline or AOM (20 mg/kg body weight) during the second and third weeks (see experimental protocol in Supporting Information Fig. 1). At the end of the experiment, colon samples were evaluated for aberrant crypt foci (ACF) formation, and markers of oxidative stress, proliferation and apoptosis (Supporting Information, Material and Methods).

All animals had a steady body weight gain during the treatment and the administration of AOM did not affect the growth of the rats (Supporting Information Table 2). Interestingly, the body weight of animals fed with cocoa diet was slightly but significantly reduced as compared with control groups (about 10%). As described elsewhere [12, 13], this effect seems to be attributed to the cocoa polyphenolic fraction and its ability to reduce fat adipose tissue. Animals were treated according to the Institutional Care Instructions (Bioethical Commission from Consejo Superior de Investigaciones Científicas, CSIC).

Administration of the colon-specific carcinogen AOM to rodents induces the development of ACF, preneoplastic lesions that may progress into cancer later on [14]. Therefore, we first investigated the efficacy of cocoa-enriched diet on inhibiting AOM-induced ACF formation. We found that all the rats injected with AOM developed aberrant crypts; however, the cocoa-enriched diet significantly reduced the AOM-induced ACF formation (Supporting Information Fig. 2). More importantly, the number of ACF with a crypt multiplicity of four or more, that have been suggested to represent a higher risk for malignant tumour progression [14], was largely reduced by cocoa feeding (Fig. 1A).

Experimental studies with rodents have demonstrated that AOM can induce ACF formation in colon by causing oxidative stress leading to DNA damage and mutations in cancer related genes [15–17]. Owing to the reported antioxidant effects of cocoa and their flavonoids, oxidative stress biomarkers in the distal colon of rats were evaluated. As shown in Fig. 1B, the levels of carbonyl groups (marker of protein oxidation) and malondialdehyde (MDA), a lipid

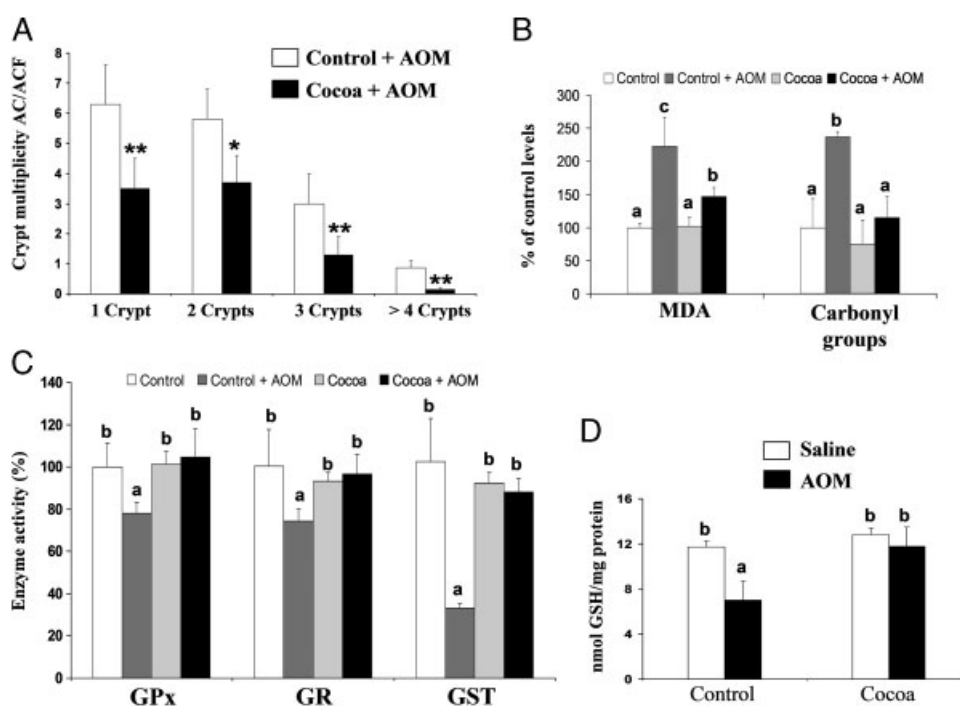


Figure 1. Number of crypt multiplicity of ACF (A), MDA and carbonyl levels (B), enzyme activity of GPx, GR and GST (C) and GSH levels (D) in colon tissues from rats injected with saline or AOM and fed with control or cocoa-enriched diet. The data represent mean \pm SD value from 10 to 12 rats in each group. Results of crypt multiplicity were statistically analyzed with Student's *t* test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; compared with the AOM control group). In the rest of comparisons, one-way ANOVA was used. Means without a common letter differ significantly, $p < 0.05$.

peroxidation end product, were significantly higher in the distal colon of control AOM-treated rats as compared with the untreated control group whereas both increases were prevented in the AOM-treated rats fed with cocoa. These results suggest that the antioxidant properties of cocoa could prevent the colonic oxidative damage induced by AOM. Supporting this, different natural antioxidant compounds have been found to prevent the generation of reactive oxygen species (ROS) and thereby inhibit AOM-induced colon carcinogenesis in animal models [18].

AOM-induced oxidative stress lowered the endogenous antioxidant/detoxification defence capacity in colon tissues of control rats, as evidenced by the significant decrease in glutathione (GSH) levels and in the activity of its related enzymes glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) and glutathione *S*-transferase (GST) (Fig. 1C and D). Nevertheless, the levels of enzymatic and non-enzymatic defences were preserved in the colon of cocoa-fed animals. Since GSH and its related enzymes participate in the detoxification of xenobiotics, carcinogens, free radicals and peroxides [19], we can suggest that cocoa could prevent AOM-induced ACF formation by reinforcing the endogenous defence capacity in colon tissues to counteract carcinogen-induced toxicity. These results are consistent with recent reports indicating that promotion of antioxidant enzyme activity has a chemopreventive effect on CRC [15, 20].

Besides inducing oxidative damage and genomic instability, ROS can specifically activate certain redox-sensitive signalling pathways and contribute to CRC

initiation/promotion through the regulation of cellular proliferation and survival [21]. The phosphatidylinositol 3-kinases/protein kinase B (PI3K/AKT) and the extracellular regulated kinase/mitogen-activated protein kinase (ERK/MAPK) are of the most important pathways activated in response to oxidative stress that promote carcinogenesis via target proteins involved in cell survival and cell cycle progression [2]. In this line, a recent *in vitro* study has showed that flavonoids such as luteolin and quercetin have anti-proliferative and pro-apoptotic effects in human CRC cells through the regulation of the ERK/MAPK and the PI3K pathways [22]. In the present work, the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) assay was used to quantify the colonocyte proliferation. Microscopic examination of colonic tissue sections clearly showed an increased level of PCNA-positive cells in the colonic mucosa of AOM-treated rats fed with control diet and a higher percentage of proliferating cells per crypt column (Fig. 2A). Indeed, the AOM-treated group fed with control diet exhibited an increase in the phosphorylation of ERKs and AKT together with an increased expression of the proliferative marker cyclin D1 (Fig. 2B and C). Conversely, cocoa intake prevented all these processes induced by AOM, suggesting that cocoa, by its ability to restrain oxidative stress could also inhibit the consequent activation of signalling pathways involved in proliferation and thereby the progression of preneoplastic lesions in the colonic epithelial cells.

Modulation of apoptosis provides an additional protective mechanism against intestinal neoplasia. Therefore, the apoptotic process in colonic samples from rats by terminal

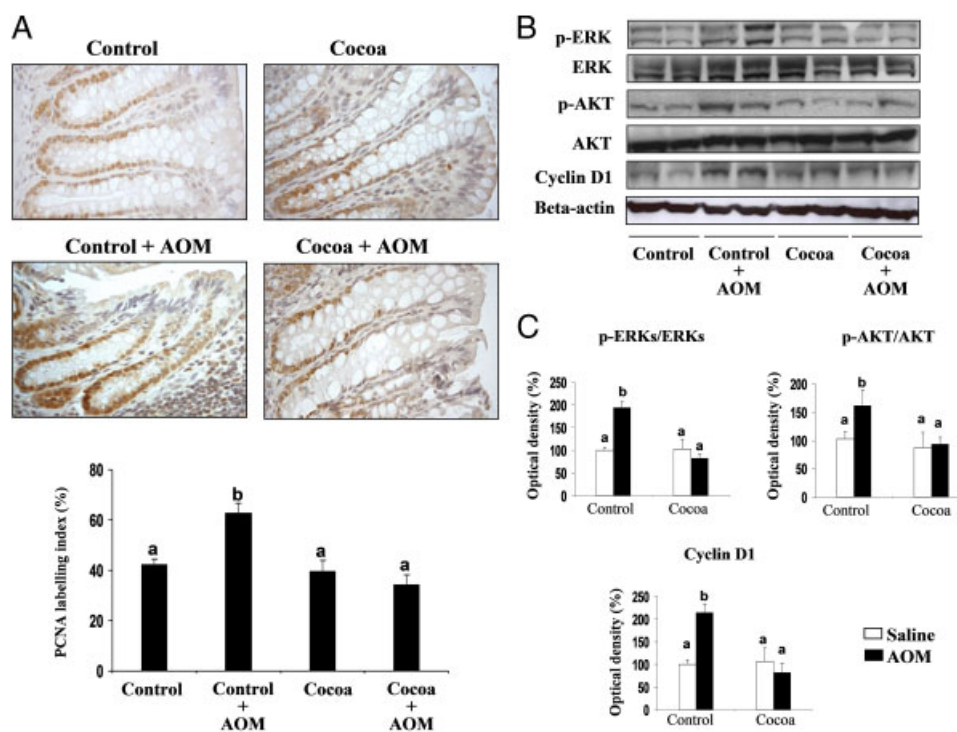


Figure 2. Representative photographs for immunohistochemical staining of PCNA-positive cells (400 × magnification) and proliferative index (A) in colon tissues from rats injected with saline or AOM and fed control or cocoa-enriched diet. Representative Western blot analyses (B) and percentage levels of total and phospho-ERKs and -AKT and cyclin D1 (C) in colon tissues from the indicated groups. Bars represent mean ± SD value from at least 10 rats in each group and for three independent experiments with two samples each in the Western blot analysis. Means without a common letter differ significantly, $p < 0.05$.

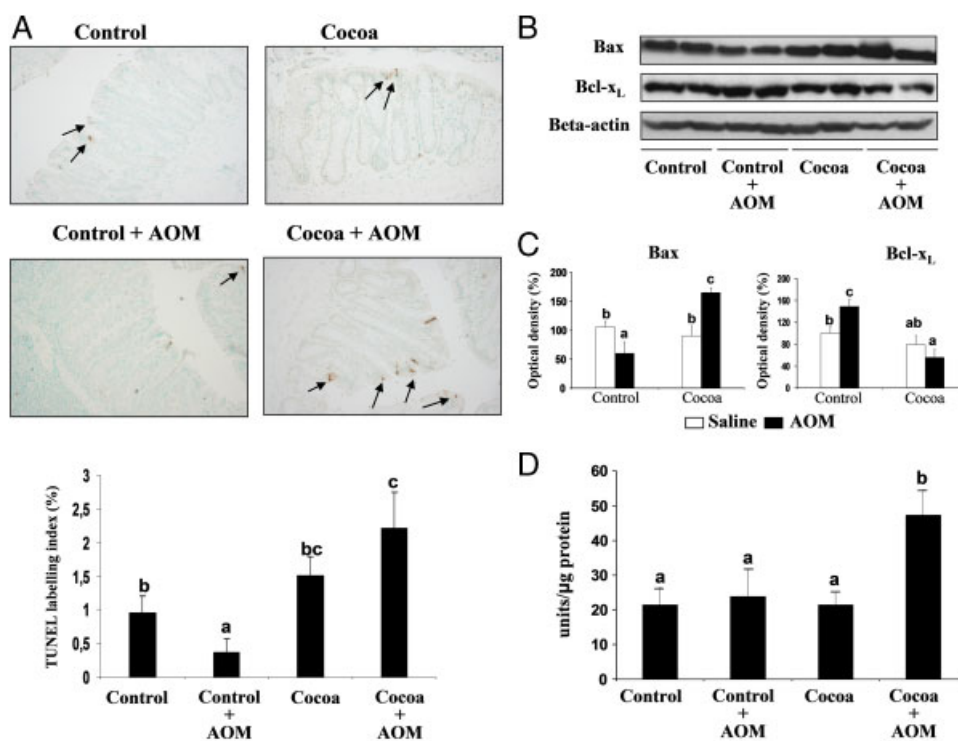


Figure 3. Representative photographs for immunohistochemical staining of TUNEL-positive cells (400× magnification) and apoptotic index (A) in colon tissues from rats injected with saline or AOM and fed with control or cocoa-enriched diet. Representative Western blot analyses (B), percentage levels of Bax and Bcl-x_L (C) and caspase-3 activity (D) in colon tissues from the indicated groups. Bars represent mean ± SD value from at least 10 rats in each group and for three independent experiments with two samples each in the Western blot analysis. Means without a common letter differ significantly, $p < 0.05$.

deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling (TUNEL) staining was further investigated. The representative photographs for TUNEL-positive cells clearly showed a pro-apoptotic effect of dietary cocoa in the colonic tissue of AOM-treated rats (Fig. 3A). Besides, the majority of the apoptotic cells were localized on the luminal surface, implicating that cocoa feeding could ensure the reestablishment of homeostasis in the colonic mucosa by removal of damaged cells. To better characterize the mechanisms involved, the colonic expression of pro-apoptotic (Bax) and anti-apoptotic (Bcl-x_L) members of the Bcl-2 protein family as well as the activity of caspase-3 were also examined. As shown in Fig. 3B and C, AOM-treatment in control rats decreased Bax expression along with a concomitant increase in Bcl-x_L proteins. However, the cocoa-enriched diet was able to increase Bax expression and decrease Bcl-x_L proteins levels. Similarly, the activity of caspase-3 was significantly increased in the AOM group that was fed with the cocoa diet (Fig. 3D). These findings indicate that cocoa-enriched diet also induces apoptosis in colonic tissues and that the mitochondrial pathway participates in this process of programmed cell death. These data agree with the recent results illustrating the apoptotic effect as a major mechanism for chemoprevention of different polyphenolic plant constituents [18, 23].

Altogether, here we have shown for the first time that a cocoa-enriched diet may suppress the early phase of chemically induced colon carcinogenesis probably by preventing oxidative stress and the subsequent activation of

redox-sensitive signalling pathways involved in cell proliferation and preneoplastic condition. Interestingly, cocoa diet was also able to induce apoptosis as another complementary mechanism of chemoprevention during the progression of carcinogenesis. Taken together, our data provide evidence that consumption of cocoa would offer a natural therapeutic approach to improve individual health status including potential efficient cancer prevention with minimal toxicity.

This work was supported by the grant AGL2007-64042/ALI and project CSD 2007-00063 from Programa Consolider-Ingenio from the Spanish Ministry of Science and Innovation (CICYT). I. Rodríguez-Ramiro is a predoctoral fellow of the Consejo Superior de Investigaciones Científicas and M. Gómez-Juaristi is a predoctoral fellow of the Spanish Ministry of Science and Education.

The authors have declared no conflict of interest.

References

- [1] Miller, P. E., Lesko, S. M., Muscat, J. E., Lazarus, P. et al., Dietary patterns and colorectal adenoma and cancer risk: a review of the epidemiological evidence. *Nutr. Cancer* 2010, 62, 413–424.
- [2] Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M., Aggarwal, B. B., Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic. Biol. Med.* 2010, 49, 1603–1616.

- [3] Visioli, F., Bernaert, H., Cortie, R., Ferri, C. et al., Chocolate, lifestyle, and health. *Crit. Rev. Food Sci.* 2009, **49**, 299–312.
- [4] Vinson, J. A., Proch, J., Bose, P., Muchler, S. et al., Chocolate is a powerful ex vivo and in vivo antioxidant, an anti-atherosclerotic agent in an animal model, and a significant contributor to antioxidants in the European and American diets. *J. Agric. Food Chem.* 2006, **54**, 8071–8076.
- [5] D'Archivio, M., Santangelo, C., Sczzocchio, B., Vari, R. et al., Modulatory effects of polyphenols on apoptosis induction: relevance for cancer prevention. *Int. J. Mol. Sci.* 2008, **9**, 213–228.
- [6] Martín, M. A., Serrano, A. B., Ramos, S., Pulido, M. I. et al., Cocoa flavonoids up-regulate antioxidant enzyme activity via the ERK1/2 pathway to protect against oxidative stress-induced apoptosis in HepG2 cells. *J. Nutr. Biochem.* 2010, **21**, 196–205.
- [7] Rodríguez-Ramiro, I., Ramos, S., Bravo, L., Goya, L. et al., Procyanidin B2 and a cocoa polyphenolic extract inhibit acrylamide-induced apoptosis in human Caco-2 cells by preventing oxidative stress and activation of JNK pathway. *J. Nutr. Biochem.* 2011, in press, DOI: 10.1016/j.jnutbio.2010.10.005.
- [8] Granado-Serrano, A. B., Martín, M. A., Haegeman, G., Goya, L. et al., Epicatechin induces NF-kappaB, activator protein-1 (AP-1) and nuclear transcription factor erythroid 2p45-related factor-2 (Nrf2) via phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B (PI3K/AKT) and extracellular regulated kinase (ERK) signalling in HepG2 cells. *Br. J. Nutr.* 2010, **103**, 168–179.
- [9] González-Sarriás, A., Espín, J. C., Tomás-Barberán, F. A., García-Conesa, M. T., Gene expression, cell cycle arrest and MAPK signalling regulation in Caco-2 cells exposed to ellagic acid and its metabolites, urolithins. *Mol. Nutr. Food Res.* 2009, **53**, 686–698.
- [10] Martín, M. A., Ramos, S., Mateos, R., Granado-Serrano, A. B. et al., Protection of human HepG2 cells against oxidative stress by cocoa phenolic extract. *J. Agric. Food Chem.* 2008, **56**, 7765–7772.
- [11] Granado-Serrano, A. B., Martín, M. A., Bravo, L., Goya, L. et al., A diet rich in cocoa attenuates *N*-nitrosodiethylamine-induced liver injury in rats. *Food Chem. Toxicol.* 2009, **47**, 2499–2506.
- [12] Matsui, N., Ito, R., Nishimura, E., Yoshikawa, M. et al., Ingested cocoa can prevent high-fat diet-induced obesity by regulating the expression of genes for fatty acid metabolism. *Nutrition* 2005, **21**, 594–601.
- [13] Ramiro-Puig, E., Pérez-Cano, F. J., Ramos-Romero, S., Pérez-Berezo, T. et al., Intestinal immune system of young rats influenced by cocoa-enriched diet. *J. Nutr. Biochem.* 2008, **19**, 555–565.
- [14] Pritchard, C. C., Grady, W. M., Colorectal cancer molecular biology moves into clinical practice. *Gut* 2011, **60**, 116–129.
- [15] Chiou, Y.-S., Tsai, M.-L., Nagabhushanam, K., Wang, Y.-J. et al., Pterostilbene is more potent than resveratrol in preventing azoxymethane (AOM)-induced colon tumorigenesis via activation of the NF-E2-Related Factor 2 (Nrf2)-mediated antioxidant signaling pathway. *J. Agric. Food Chem.* 2011, **59**, 2725–2733.
- [16] Ashokkumar, P., Sudhandiran, G., Protective role of luteolin on the status of lipid peroxidation and antioxidant defense against azoxymethane-induced experimental colon carcinogenesis. *Biomed. Pharmacother.* 2008, **62**, 590–597.
- [17] Sengottuvelan, M., Senthilkumar, R., Nalini, N., Modulatory influence of dietary resveratrol during different phases of 1,2-dimethylhydrazine induced mucosal lipid-peroxidation, antioxidant status and aberrant crypt foci development in rat colon carcinogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 2006, **1760**, 1175–1183.
- [18] Pan, M.-H., Lai, C. S., Wu, J.-Ch., Ho, C.-T., Molecular mechanisms for chemoprevention of colorectal cancer by natural dietary compounds. *Mol. Nutr. Food Res.* 2011, **55**, 32–45.
- [19] Masella, R. T., Di Benedetto, R., Varý, R., Filesi, C. et al., Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J. Nutr. Biochem.* 2005, **16**, 577–586.
- [20] Cheung, K. L., Khor, T. O., Huang, M.-T., Kong, A.-N., Differential in vivo mechanism of chemoprevention of tumor formation in azoxymethane/dextran sodium sulfate mice by PEITC and DBM. *Carcinogen* 2010, **31**, 880–885.
- [21] Storz, P., Reactive oxygen species in tumor progression. *Front. Biosci.* 2005, **10**, 1881–1896.
- [22] Xavier, C. P. R., Lima, C. F., Preto, A., Seruca, R. et al., Luteolin, quercetin and ursolic acid are potent inhibitors of proliferation and inducers of apoptosis in both KRAS and BRAF mutated human colorectal cancer cells. *Cancer Lett.* 2009, **281**, 162–170.
- [23] Volate, S. R., Davenport, D. M., Muga, S. J., Wargovich, M. J., Modulation of aberrant crypt foci and apoptosis by dietary herbal supplements (quercetin, curcumin, silymarin, ginseng and rutin). *Carcinogen* 2005, **26**, 1450–1456.



**Supporting Information
for Mol. Nutr. Food Res.
DOI 10.1002/mnfr.201100363**

Ildefonso Rodríguez-Ramiro, Sonia Ramos, Elvira López-Oliva,
Angel Agis-Torres, Miren Gómez-Juaristi, Raquel Mateos, Laura
Bravo, Luis Goya and María Ángeles Martín

**Cocoa-rich diet prevents azoxymethane-induced colonic preneoplastic lesions
in rats by restraining oxidative stress and cell proliferation and inducing
apoptosis**

Supporting information:

Cocoa rich diet prevents azoxymethane-induced colonic preneoplastic lesions in rats by restraining oxidative stress and cell proliferation and inducing apoptosis.

Ildefonso Rodríguez-Ramiro¹, Sonia Ramos¹, Elvira López-Oliva², Angel Agis-Torres², Miren Gómez-Juaristi¹, Raquel Mateos¹, Laura Bravo¹, Luis Goya¹ and Maria Angeles Martín^{1,3*}

Material and Methods

Materials and Chemical

AOM, *o*-phthalaldehyde (OPT), nicotine adenine dinucleotide reduced salt (NADH), nicotine adenine dinucleotide phosphate reduced salt (NADPH), dinitrophenylhydrazine (DNPH) and glutathione reductase (GR) were purchased from Sigma Chemical (Madrid, Spain). Caspase-3 substrate (Ac-DEVD-AMC, N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-methylcoumarin) was purchased from Pharmingen (San Diego, CA). Anti-AKT, antiphospho-AKT (p-AKT), anti-ERKs, antiphospho-ERKs (p-ERKs), and anti- β -actin were obtained from Cell Signaling Technology (Izasa, Madrid, Spain). Anti-cyclin D1, anti-Bax and anti-Bcl-x_L (sc-718, sc-516 and sc-634, respectively) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Quimigen, Madrid, Spain). Anti-PCNA Ab-1 was purchased from Lab Vision Corporation (Bionova científica SL, Madrid, Spain). Terminal Transferase recombinant, biotin-16-dUTP and proteinase K were from Roche Applied Science (Roche Diagnostic, GmbH, Spain). Materials and chemicals for electrophoresis and the Bradford reagent were from BioRad (BioRad Laboratories S.A., Madrid, Spain).

Animals and experimental design

Forty eight male Wistar Han rats (5 weeks old) were purchased from Harlan Laboratories Models, S.L. (Barcelona, Spain). Animals were placed individually in stainless steel wire-bottomed metabolic cages housed in a room under controlled conditions (19–23°C, 50–60% humidity and 12 h light/darkness cycles). After one week of acclimation, rats were randomly assorted into four different experimental groups (12 animals per group) (Fig. 1) and were provided with food and water *ad libitum*. Two groups received the standard diet (control) and two groups were fed with the cocoa rich diet (cocoa). Two weeks later, one control and one cocoa group were injected with AOM (20 mg/Kg bw) and the other control and cocoa groups with saline, once a week for two consecutive weeks. Rats were sacrificed in the eight week and the entire colon was resected and cleaned with PBS. Sections (1 cm) from the most distal portion of the colon were fixed in 4% paraformaldehyde for immunohistochemical analyses for proliferation and apoptosis assessment. The remaining mid-section of the colon was cut open longitudinally to obtain two strips; one half was used for the ACF assay and the other half was used for the rest of the analyses. Animals were treated according to the Institutional Care Instructions (Bioethical Commission from Consejo Superior de Investigaciones Científicas, CSIC).

Determination of ACF

Colon strips designed for ACF assay were fixed flat between paper towels in 70% ethanol at 4°C during 24 h, and coded to be scored blindly. The fixed colonic segments were stained for 5 min with a 0.2% methylene blue solution in PBS, and then cleared from the staining solution with PBS. Methylene blue-stained ACF were identified in the colonic sections by placing mucosal side up on a microscopic slide to visualize crypt outlines using

light microscopy (40x magnification) [1]. Aberrant crypts (AC) show morphological differences with normal crypts, appearing as collections (1 to 4) of elevated crypts (aberrant crypt focus) with increased staining and expanded pericryptal spaces, and distorted crypt openings [2]. The number of ACF in each colonic strip is expressed relative to its dimension (ACF/cm² colonic strip). Crypt multiplicity refers to the number of aberrant crypt per focus (AC/ACF), and four categories were considered for this parameter: 1, 2, 3, and 4 or more AC/ACF. The number of the ACF observed belonging to each defined category was recorded for every colonic strip studied.

Immunohistopathological analyses for PCNA and TUNEL

Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) immunohistochemistry was performed by using standard streptavidin-peroxidase technique. Briefly, tissues were dewaxed and rehydrated followed by antigen retrieval through microwaving in 10 mM sodium citrate buffer (pH 6.0). Endogenous peroxidase was inhibited by incubation in 3% H₂O₂ in absolute methanol for 5 min. The sections were incubated with mouse monoclonal anti-PCNA IgG (PC-10) at a dilution of 1:200 at 4 °C overnight. A secondary antibody, biotinylated goat anti-mouse IgG, was then applied for 30 min in a 1:500 dilution. Slices were incubated with HRP-conjugated streptavidin and then visualized with 3,3'-diaminobenzidine (DAB) and counterstained with Harris's hematoxylin. At least 20 perpendicular well-oriented crypts were examined in each animal under light microscopy at 400x magnification (Leica DM LB2 microscope and a digital Leica DFC 320 camera.). Proliferative index was calculated as the mean number of PCNA-positive cells divided by the number of total cells per crypt multiplied by 100.

Apoptotic colonocytes were detected using the terminal transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) procedure [3]. Tissue sections after deparaffinization and rehydration

were permeabilized with proteinase K (20 µg/mL) for 15 min at 37°C, then treated with 3% hydrogen peroxide for 5 min to quench endogenous peroxidase activity. After thorough washing with $2 \times$ PBS, sections were incubated with equilibration buffer for 10 min, followed by immediate application of TdT-enzyme working for 1 h at 37°C in a humidity chamber. The reaction was stopped and the incorporated biotinylated nucleotides were detected by peroxidase conjugated streptavidin and subsequent staining with DAB and counterstaining with methyl green. For each animal, total number of apoptotic cells and total number of cells/crypt column were determined in 50 full-length, well orientated, crypts. The apoptotic index represents the proportion of cells undergoing apoptosis within a crypt column (400×).

Determination of protein carbonyl and MDA levels

Colon tissues were homogenized (1:5 w/v) in 0.25 M Tris, 0.2 M sucrose and 5 mM 1,4-dithiothreitol (DTT) buffer pH 7.4 and centrifuged at 3000g for 15 min. Protein oxidation of colon homogenates was measured as carbonyl groups content according to the method of Richert et al. [4]. Absorbance was measured at 360 nm and carbonyl content was expressed as nmol/mg protein using an extinction coefficient of $22000 \text{ nmol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Malondialdehyde (MDA) was analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) as its 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) derivative [5]. MDA values are expressed as nmol MDA/mg protein. Protein in colon homogenates was determined by the Bradford reagent.

Determination of GPx, GR and GST activities

The activity of glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) and glutathione-S transferase (GST) was determined in colon homogenates. Colon tissues were homogenized (1:5 w/v) in 0.25 M Tris, 0.2 M sucrose and 5 mM 1,4-dithiothreitol (DTT)

buffer pH 7.4 and centrifuged at 3000g for 15 min. Determination of GPx activity is based on the oxidation of GSH by GPx, using *t*-BOOH as a substrate, coupled to the disappearance of NADPH by GR [6]. GR activity was determined by following the decrease in absorbance due to the oxidation of NADPH utilized in the reduction of oxidized glutathione [7]. Analysis of GST was carried by the Biovision Commercial kit GST fluorometric activity assay (Bio Vision, Deltaclon, Madrid, Spain). Protein was measured by the Bradford reagent.

Determination of GSH

The content of reduced glutathione (GSH) was quantitated by the fluorometric assay of Hissin and Hilf [8]. The method is based on the reaction of GSH with OPT at pH 8.0, which generates fluorescence. Colon tissues were homogenized (1:20 w/v) in 50 mM phosphate buffer pH 7.0, proteins precipitated with 5% trichloroacetic acid and then centrifuged for 30 min at 10,000g. Fluorescence was measured at an excitation wavelength of 340 nm and emission wavelength of 460 nm. The results were interpolated in a GSH standard curve (5 ng-1 µg) and expressed as nmol GSH/mg protein, which was determined by the Bradford reagent.

Preparation of cell lysates for Western blotting

Samples of frozen colon were homogenized 1:10 (w:v) in extraction buffer [50 mM HEPES (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 10% glycerol, 10 mM Na₄P₂O₇, 10 mM NaF, 2 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 2 mM Na₃VO₄, 5 µg/mL leupeptin, 20 µg/mL aprotinin, 2 mM benzamidin and 2 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF)] to detect ERKs, p-ERKs, AKT, p-AKT, cyclin D1, Bax, and Bcl-x_L levels. Homogenates were centrifuged at 14000g for 60 min and the supernatants were collected, assayed for

protein concentration by using the Bradford reagent, aliquoted and stored at -80°C until use for Western blot analyses.

Protein determination by Western Blotting

Equal amounts of protein (100 µg) were separated by SDS–PAGE and transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) filters (Protein Sequencing Membrane). Membranes were probed with the corresponding primary antibody followed by incubation with peroxide-conjugated antirabbit Ig (GE Healthcare, Madrid, Spain). Blots were developed with the ECL system (GE Healthcare, Madrid, Spain). Normalization of Western blot was ensured by β -actin and band quantification was carried out with a scanner and the Scion Image software.

Caspase-3 activity

Activation of caspase-3 was determined as previously described [9]. Briefly, colon tissues were lysed (1:5 w/v) in a buffer containing 5 mM Tris (pH 8), 20 mM EDTA, and 0.5% Triton X-100. The reaction mixture contained 20 mM HEPES (pH 7), 10% glycerol, 2 mM DTT, 50 µg of protein per condition and 20 µM Ac-DEV-DAMC as substrate. Enzymatic activity was determined by measuring fluorescence at an excitation wavelength of 380 nm and an emission wavelength of 440 nm (Bio-Tek, Winooski, VT, USA).

Statistical analysis

Following the assurance of normal distribution of data, a Student's t-test was used to assess the statistical significance of ACF formation between control and cocoa AOM groups. In the rest of comparisons, one-way analysis of variance was used followed by a Bonferroni test when variances were homogeneous or by the Tamhane test when variances

were not homogeneous. Differences were considered statistically significant if $p < 0.05$ (statistical package SPSS v.19.0).

Figure 1.- Experimental design for AOM-induced colon carcinogenesis.

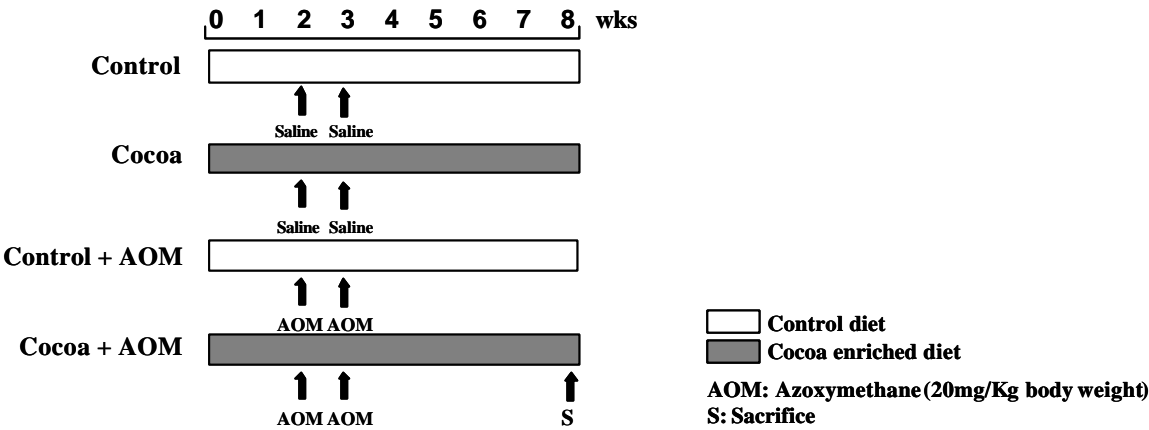


Figure 2.- The mucosal surface of the colons from rats injected with AOM and fed with control or cocoa enriched diet was stained with methylene blue (A). The number of total colon ACF (B) were counted under a light microscope (40x magnification). The data represent mean \pm SD value from 12 rats in each group. Results were statistically analyzed with Student's t test (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; compared to the AOM control group).

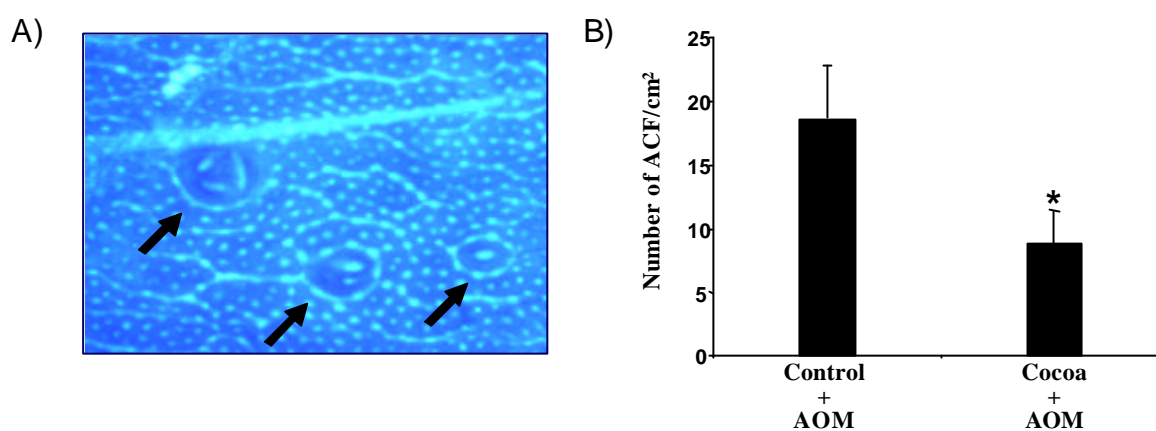


Table 1. Composition of the experimental control and cocoa-rich diets

Component (g/Kg dry weight)	Control	Cocoa
Casein	140	140
Dextrose	155	155
Sucrose	100	100
Fat	40	40
t-BHQ (<i>tert</i> -butylhydroquinone)	0.008	0.008
Mineral mix.	35	35
Vitamin mix.	10	10
L-Cys	1.8	1.8
Cholin bitartrate	2.5	2.5
Cellulose	100	59.2
Starch	415.7	336.5
Cocoa powder	-	120

Table 2. Body weight, colon weight and length and food intake of rats in saline and AOM injected groups fed with control and cocoa-rich diets*.

	Control	Control + AOM	Cocoa	Cocoa + AOM
Initial body weight (g)	41.5 ? 3.5 ^a	41.2 ? 3.9 ^a	42.2 ? 4.0 ^a	43.5 ? 3.2 ^a
Final body weight (g)	203.8 ? 18.1 ^a	193.1 ? 10.0 ^a	173.8 ? 7.9 ^b	176.1 ? 13.7 ^b
Colon weight (g)	0.69 ? 0.13 ^a	0.69 ? 0.08 ^a	0.67 ? 0.11 ^a	0.70 ? 0.07 ^a
Colon length (cm)	15.1 ? 0.8 ^a	15.7 ? 1.4 ^a	14.9 ? 1.0 ^a	15.6 ? 0.8 ^a
Total Food Intake (g)	581.5 ? 3.4 ^a	572.8 ? 5.4 ^a	592.5 ? 8.9 ^a	587.3 ? 10.78 ^a

* Data represent the means ? SD (n=10-12). Means in a row without a common letter differ, $P < 0.05$.

During the study period, rats fed with cocoa diets had food intakes similar to their corresponding control animals. However, the body weight of animals fed with cocoa diet was slightly but significantly reduced as compared to control groups (about 10%). On the other hand, there was no difference among the mean colon weights or lengths of any group of animals at the time of killing. Furthermore, no pathologic alterations were found among the groups in any organs by gross observation, including liver, lung, and kidney.

References

- [1] Lasko, C.M., Bird, R.P. Modulation of aberrant crypt foci by dietary fat and caloric restriction: the effects of delayed intervention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1995, 4, 49-55.
- [2] Pretlow, T. P., O'Riordan, M. A., Pretlow, T. G., Stellato, T. A. Aberrant crypts in human colonic mucosa: Putative preneoplastic lesions. *J Cell Biochem.* 1992, 16, 55-62.
- [3] Gavrieli, Y., Sherman, Y., Ben-Sasso, S.A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992, 119, 493-501.
- [4] Richert, S., Wehr, N., Stadtman, E., Levine, R. Assessment of skin carbonyl content as a non invasive measure of biological age. *Arch Biochem Biophys* 2002, 397, 430–432.
- [5] Mateos, R., Goya, L., Bravo, L. Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative. A marker for oxidative stress in cell cultures of human hepatoma HepG2. *J Chromatogr B* 2004, 805, 33–39
- [6] Goldberg, D.M., Spooner, R.J., In: Bergmeyer, H.V. (Ed.), *Glutathione reductase. Methods of enzymatic analysis*, Weinheim, Verlag-Chemie. 1987, pp. 258-265.
- [7] Alia, M., Horcajo, C., Bravo, L., Goya, L. Effect of grape antioxidant dietary fiber on total antioxidant capacity and the activity of liver antioxidant enzymes in rats. *Nutr Res.* 2003, 23, 1251–1267
- [8] Gunzler, W.A., Kremers, H., Flohe, L. An improved coupled test procedure for glutathione peroxidase. *Klin Chem Klin Biochem* 1974, 12, 444-448.
- [9] Granado-Serrano, A., Martín, M., Izquierdo-Pulido, M., Goya, L., et al. Molecular mechanisms of epicatechin and chlorogenic acid on the regulation of the apoptotic and survival/proliferation pathways in a human hepatoma cell line. *J Agric Food Chem* 2007, 55, 2020–2027.

**Cocoa polyphenols prevent inflammation in colon of azoxymethane-treated rats
and in TNF- α -stimulated Caco-2 cells.**

Ildefonso Rodríguez-Ramiro¹, Sonia Ramos¹, Elvira López-Oliva², Angel Agis-Torres², Laura Bravo¹, Luis Goya¹ and Maria Angeles Martín^{1*}

¹*Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC), Madrid, Spain.*

²*Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain.*

* Corresponding author:

María Ángeles Martín. Departamento de Metabolismo y Nutrición, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC). José Antonio Novais 10, Ciudad Universitaria, 28040, Madrid, Spain. Phone: +34.91.544.56.07; Fax: +34.91.549.36.27; e-mail: amartina@ictan.csic.es

Running head: Cocoa polyphenols prevent colon inflammation

Keywords: Colorectal cancer; Nuclear factor- κ B; Cyclooxygenase-2; Inducible nitric oxide synthase

Abstract

Numerous evidences support a relationship between intestinal inflammation and cancer. Therefore, much attention has been recently focused on the identification of natural compounds with anti-inflammatory activities as a strategy to suppress the early stages of colorectal cancer. Because cocoa is a rich source of bioactive compounds, this study investigated its anti-inflammatory properties in a rat model of azoxymethane (AOM)-induced colon carcinogenesis and in TNF α stimulated Caco-2 cells.

Rats fed control or cocoa-enriched diets during eight weeks were injected with saline or AOM during the third and fourth week and colon samples were evaluated for markers of inflammation at the end of the 8-weeks experiment. Additionally, the anti-inflammatory activity of a cocoa polyphenolic extract was examined in TNF α stimulated Caco-2 cells, an *in vitro* model of experimentally-induced intestinal inflammation. The signalling pathways involved, including nuclear factor- κ B (NF- κ B) and the mitogen-activated protein kinases family (MAPKs) such as c-Jun NH2-terminal kinases (JNKs), extracellular signal regulated kinases (ERKs) and p38 were also evaluated. Our results show that cocoa-rich diet decreases the levels of nuclear NF- κ B and the expression of pro-inflammatory enzymes such as cyclooxygenase-2 (COX-2) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) induced by AOM in colon. In addition, experiments in Caco-2 cells confirm that cocoa polyphenols effectively down-regulate the levels of the inflammatory markers induced by TNF α by inhibiting NF- κ B translocation and JNKs phosphorylation.

We conclude that cocoa polyphenols suppress inflammation-related colon carcinogenesis induced by AOM and thus could be promising in dietary prevention of intestinal inflammation and related cancer development.

Introduction

Colorectal cancer (CRC) is a major healthcare problem and the third most common cause of all cancer deaths⁽¹⁾. Colon carcinogenesis is a complex multistep process from small benign precursor lesions to metastatic carcinomas⁽²⁾. During this progression, chronic inflammation is causally linked to carcinogenesis and acts as a driving force in premalignant and malignant transformation of cells⁽³⁾.

The early stages of colon carcinogenesis involve an increase in the pro-inflammatory enzymes cyclooxygenase-2 (COX-2) and the inducible nitric oxide synthase (iNOS)⁽⁴⁾. COX-2 and iNOS are implicated in chronic inflammation, which creates a microenvironment contributing to the development of preneoplastic lesions in the colon carcinogenesis⁽⁵⁾. More importantly, inhibition of these two enzymes has shown protective effects against colon tumour development in different animal models, suggesting that they are crucial targets for mucosa inflammation and colon tumorigenesis⁽⁶⁾. Likewise, the redox-sensitive eukaryotic transcription factor, nuclear factor- κ B (NF- κ B), that regulates the expression of iNOS and COX-2, has been related to inflammation-induced colon carcinogenesis and its inhibition also prevents cancer progression⁽⁷⁾. Therefore, the use of chemo-preventive compounds that suppress inflammation seems to be a useful strategy to control the development and progression of CRC.

According to that, considerable attention has been recently focused on the identification of dietary bioactive compounds with anti-inflammatory activities as an alternative natural source for prevention of inflammation-associated diseases⁽⁸⁾. Evidence from epidemiological studies suggests that a high consumption of fruits and vegetables and intake of certain non nutrients that are present in foods reduce the risk of CRC⁽⁹⁾. These beneficial effects have been partly attributable to polyphenolic phytochemicals, which have

68 a wide range of pharmacological properties, including antioxidant, anti-inflammatory and
69 anti carcinogenic activities⁽¹⁰⁾. The molecular mechanisms underlying their chemo-
70 preventive effects have been associated with the modulation of signalling cascades, genes
71 expression involved in the regulation of cell proliferation and apoptosis and the suppression
72 of chronic inflammation⁽¹¹⁾.

73 At present, cocoa and its phenolic compounds, the flavanols epicatechin, catechin and
74 procyanidins, have attracted a great deal of interest because of their potential ability to act
75 as highly effective chemo-preventive agents^(12,13). As antioxidants, cocoa flavanols have
76 been shown to protect cell constituents, limiting the risk factor for cancer and other chronic
77 diseases⁽¹⁴⁾. Accordingly, we have recently shown that a cocoa-rich diet could prevent the
78 early stages of colon carcinogenesis by reducing oxidative stress and cell proliferation and
79 by inducing apoptosis⁽¹⁵⁾. Additionally, they can display other chemo-preventive properties
80 which may be independent of conventional antioxidant activities. In particular, recent *in*
81 *vitro* studies have demonstrated that cocoa phenolic compounds exhibited a variety of
82 potential anti-inflammatory effects in intestinal cells⁽¹⁶⁾, which may contribute to their
83 cancer chemo-preventive activity. However, those mechanisms have not yet been
84 investigated in *in vivo* studies of colon carcinogenesis.

85 Considering this, in the present study we have used the well defined azoxymethane
86 (AOM)-induced colon cancer model in rats to investigate the anti-inflammatory effect of a
87 cocoa-rich diet. In addition, to gain further insight into the mechanisms involved we tested
88 the anti-inflammatory effect of a cocoa polyphenolic extract in an *in vitro* model of
89 inflammation using human intestinal Caco-2 cells and TNF α as a pro-inflammatory stress.
90 Our results indicated that cocoa polyphenols could suppress intestinal inflammation *in vivo*
91 and *in vitro* through the inhibition of NF- κ B signalling and the down-regulation of pro-
92 inflammatory enzymes expression.

93

Matherial and methods

Materials and Chemical

AOM, *o*-phthalaldehyde (OPT), gentamicin, penicillin G and streptomycin were purchased from Sigma Chemical (Madrid, Spain). Anti-ERKs, antiphospho-ERKs (p-ERKs), anti-JNKs, antiphospho-JNKs (p-JNKs), antiphospho-p38, and anti- β -actin were obtained from Cell Signalling Technology (Izasa, Madrid, Spain). Anti p38, anti-p65 (NF- κ B), anti-iNOS and anti-COX-2 were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Quimigen, Madrid, Spain). RNA isolation kit was obtained from Applied Biosystems/Ambion (TX, USA), primers for RT-PCR were from Isogen (Barcelona, Spain), dNTPs and reverse transcriptase were from Promega (Madrid, Spain), and Taq polymerase was obtained from Roche (Barcelona, Spain). Materials and chemicals for electrophoresis and the Bradford reagent were from BioRad (BioRad Laboratories S.A., Madrid, Spain). Cell culture dishes were from Falcon (Cajal, Madrid, Spain) and cell culture medium and foetal bovine serum (FBS) from Biowhittaker Europe (Innogenetics, Madrid, Spain).

Cocoa

Natural Forastero cocoa powder (a kind gift from Nutrexp, Barcelona, Spain) containing epicatechin (383.5 mg/100 g), catechin (116 mg/100 g) and procyanidins (254.5 mg/100 g) was used for this study. A detailed description of this cocoa is given elsewhere⁽¹⁷⁾.

For the *in vivo* experiments, diets were prepared from an AIN-93G formulation (Panlab S.L., Barcelona, Spain). The 12% cocoa diet was produced by adding 120 g/kg cocoa to AIN-93G at the expense of starch and cellulose. The composition of the diets is

118 given in Table 1; cocoa powder contains 26% proteins and 12% lipids. This powdered
119 supplement was formulated to provide 0.9 g of polyphenols per kg of diet.

120 For the *in vitro* experiments, a cocoa polyphenolic extract (CPE) was prepared by
121 sequentially washing 1 g of cocoa with 40 mL of 16 mM hydrochloric acid in 50% aqueous
122 methanol (50:50, v/v, 1 hour at room temperature, constant shaking) and 40 mL of acetone-
123 water (70:30, v/v, 1 hour room temperature, constant shaking) in 50 mL centrifuge tubes.
124 After centrifugation (15 min, 3000 g), supernatants from each extraction step were
125 combined and made up to 100 mL. The desiccated extract was dissolved in distilled water
126 and kept frozen until assay. The total polyphenol content of the cocoa polyphenolic extract
127 (CPE) was determined by the spectrophotometric method of Folin-Ciocalteu using gallic
128 acid as standard. A Beckman DU640 spectrophotometer (Beckman Instruments Inc.,
129 Fullerton, CA) was used.

130

131 *Animals and experimental design*

132 Forty male Wistar Han rats (5 weeks old) were purchased from Harlan Laboratories
133 Models, S.L. (Barcelona, Spain). Animals were placed individually in stainless steel wire-
134 bottomed metabolic cages housed in a room under controlled conditions (19–23°C, 50–60%
135 humidity and 12 h light/darkness cycles). After one week of acclimation, rats were
136 randomly assorted into four different experimental groups (Fig. 1a) and were provided with
137 food and water *ad libitum*. Two groups received the standard diet (control) and two groups
138 were fed with the cocoa rich diet (cocoa). Two weeks later, one control and one cocoa
139 group were injected with AOM (20 mg/kg bw) and the other control and cocoa groups with
140 saline, once a week for two consecutive weeks. Rats were sacrificed in the eighth week and
141 the entire colon was resected and cleaned with PBS. Sections (1 cm) from the most distal
142 portion of the colon were fixed in 10% neutral-buffered formalin for histological and

143 immunohistochemical analyses. The remaining mid-section of the colon was used for
 144 mRNA analyses. Animals were treated according to the Institutional Care Instructions
 145 (Bioethical Commission from Consejo Superior de Investigaciones Cientificas, CSIC).

146

147 *Cell culture and treatments*

148 Human Caco-2 cells were grown in a humidified incubator containing 5% CO₂ and
 149 95% air at 37 °C. They were grown in DMEM F-12 medium from Biowhitaker (Lonza,
 150 Madrid, Spain), supplemented with 10% Biowhitaker foetal bovine serum (FBS) and 50
 151 mg/L of each of the following antibiotics: gentamicin, penicillin and streptomycin. Plates
 152 were changed to FBS-free medium the day before the assay.

153 For the TNF α treatment, different concentrations of TNF α (10, 20 and 40 ng/ml),
 154 diluted in serum-free culture medium were added to the cell plates. For the CPE treatment,
 155 10 μ g/mL of CPE diluted in serum-free culture medium and filtered through a 0.2 μ m
 156 membrane was added to the cell plates for 20 hours. When incubation with CPE was prior
 157 to TNF α stimulation, after 20 h pre-treatment culture medium containing the CPE was
 158 removed and fresh culture medium containing the pro-inflammatory TNF α added for 24 h.

159

160 *Histological and immunohistochemical analyses.*

161 Samples from distal colon fixed in 10% neutral-buffered formalin were sectioned and
 162 stained with haematoxylin and eosin (H&E) for histological evaluation. Nuclear factor- κ B
 163 (NF- κ B) p65 immunohistochemistry was performed in histological sections of colonic
 164 mucosa. Briefly, serial sections of colon were deparaffinised in xylene, rehydrated in
 165 graded ethanol, washed in phosphate-buffered saline, and heated in microwave at 98°C,
 166 with 0.01 mol/L sodium citrate buffer (pH 6.0). Peroxide blocking was performed with
 167 0.3% H₂O₂ in methanol at room temperature for 5 minutes. The sections were incubated

with rabbit polyclonal anti- NF- κ B p65 (dilution 1:100) at 4°C overnight. A secondary antibody, goat anti-rabbit, was then applied for 30 min in a 1:200 dilution. Slices were incubated with HRP-conjugated streptavidin and then visualized with 3,3'-diaminobenzidine (DAB) and counterstained with Harris's hematoxylin. NF- κ B (p65) expression was detected as nuclear and cytoplasmic brown staining. The number of nuclear NF- κ B (p65) positive epithelial cells was examined under light microscopy at 400x magnification (Leica DM LB2 microscope and a digital Leica DFC 320 camera) and quantified by a percentage score (Mean \pm SEM) with grading between 0 and 4: 0, no nuclear staining; 1, 1-10% positive cells; 2, 10-30% positive cells; 3, 30-60% positive cells; 4, 60-100% positive cells. As a positive internal control, we used NF- κ B/p65 expression in lymphocytes and endothelial cells of the tissue sample, which showed positive nuclear staining in all runs. Negative controls were used during optimization of the method.

180

181 *Determination of COX-2 and iNOS expression in colon tissues.*

182 Total RNA was extracted from rat distal colon using the RNA isolation kit (Totally
183 RNA kit, Applied Biosystems/Ambion, TX, USA) as described in the manufacturer's
184 manual. One microgram of total RNA was submitted to reverse transcriptase and the cDNA
185 products were amplified by PCR using the following couples of primers: 5'-
186 CCCTTCCGAAGTTTCTGGCAGCAGC-3' and 5'-
187 GGCTGTCAGAGAGCCTCGTGGCTTTGG-3' for amplification of iNOS, 5'-
188 GGAGAGACTATCAAGATAGTGATC-3' and 5'-
189 ATGGTCAGTAGACTTTTACAGCTC-3' for COX-2 and 5'-
190 ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' and 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3' for
191 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as a housekeeping gene. The
192 samples were incubated in a Thermo Cycler (PCR Express, Thermo Hybaid, Ashford, UK)

193 using the following parameters: 94°C for 1 min, 64°C for 1 min and 72°C for 1 min (35
 194 cycles) followed by a 10 min extension at 72°C for COX-2 amplification; 94°C for 1 min,
 195 55°C for 1 min and 72°C for 1 min (35 cycles) followed by a 10 min extension at 72°C for
 196 iNOS and 92°C for 1 min, 55°C for 1 min and 72°C for 1 min (35 cycles) followed by a 10
 197 min extension at 72°C for GAPDH amplification. The PCR products were electrophoresed
 198 on a 1.5% agarose gel containing ethidium bromide. The gel was photographed under
 199 ultraviolet transillumination and the bands were quantified by laser scanning densitometry
 200 (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA). Band intensity was normalized to values for
 201 GAPDH that was used as an internal control.

202

203 *Determination of interleukin-8 (IL-8) secretion by Caco-2 cells*

204 Concentration of IL-8 in cell culture supernatants was determined using a human IL-8
 205 ELISA kit of BD Biosciences (San Jose, CA) according to manufacturer's instructions. The
 206 ELISA 96-well micro plates were analyzed using a microplate reader at 570 nm (Bio-Tek,
 207 Winooski, VT, USA).

208

209 *Preparation of cell lysates for Western blotting*

210 To detect ERKs, p-ERKs, JNK, p-JNK, p38, p-p38, iNOX and COX-2 levels, Caco-2
 211 cells were lysed at 4 °C in a buffer containing 25 mM HEPES (pH 7.5), 0.3 M NaCl, 1.5
 212 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM 1,4-dithiothreitol (DTT), 0.1% Triton X-100, 200
 213 mM β-glycerolphosphate, 0.1 mM Na₃VO₄, 2 µg/mL leupeptin, and 1 mM
 214 phenylmethanesulphonyl fluoride (PMSF). The supernatants were collected, assayed for
 215 protein concentration using the Bradford reagent, aliquoted and stored at -80 °C until used
 216 for Western blot analyses.

217

218 *Preparation of nuclear and cytosolic cellular extracts*

219 To evaluate the cytosolic and nuclear NF- κ B p65 content, cells were resuspended at
220 4°C in 10 mM HEPES pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 0.2 mM PMSF
221 (buffer A), allowed to swell on ice for 10 min; and then vortexed for 10 s. Samples were
222 centrifuged at 10,000 g for 2 min and the supernatant containing the cytosolic fraction was
223 stored at -80 °C. The pellet was resuspended in cold buffer B (20 mM HEPES pH 7.9, 25
224 % glycerol, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.2 mM PMSF,
225 2.5 µg/mL leupeptin, 2.5 µg/mL aprotinin) and incubated on ice for 20 min for high salt
226 extraction. Cellular debris was removed by centrifugation at 13,000 g for 10 min at 4 °C,
227 and the supernatant fraction containing nuclear protein extract was stored at -80 °C. Protein
228 content was measured using the Bradford reagent.

229

230 *Protein determination by Western Blotting*

231 Equal amounts of protein (40 µg) were separated by SDS-PAGE and transferred to
232 polyvinylidene difluoride (PVDF) filters (Protein Sequencing Membrane). Membranes
233 were probed with the corresponding primary antibody followed by incubation with
234 peroxide-conjugated antirabbit Ig (GE Healthcare, Madrid, Spain). Blots were developed
235 with the ECL system (GE Healthcare, Madrid, Spain). Anti-growth factor receptor-bound
236 protein 2 (GRB2) and anti-poly (ADP-ribose) polymerase antibodies (PARP) were used as
237 markers for the cytosolic and nuclear extracts, respectively. Normalization of Western blot
238 was ensured by β -actin and bands quantification was carried out with a scanner (HP Scanjet
239 G2710, HP, Madrid, Spain) and the Scion Image software (Scion Corporation, MD, USA).

240

241 *Statistical analysis*

242 Following the assurance of normal distribution of data, a Student's t-test was used to
243 assess the statistical significance of ACF formation between control and cocoa AOM
244 groups. In the rest of comparisons, one-way analysis of variance was used followed by a
245 Bonferroni test when variances were homogeneous or by the Tamhane test when variances
246 were not homogeneous. Differences were considered statistically significant if $P < 0.05$
247 (statistical package SPSS v.19.0).

248

249

250 **Results**

251 *General observations and histological changes*

252 During the study period, rats fed with cocoa diets had food intakes similar to their
253 corresponding control animals (data not shown). However, the body weight of animals fed
254 with cocoa diet was slightly but significantly reduced as compared to control groups (about
255 10%) at weeks 5-7. As described elsewhere^(18,19) this effect seems to be attributed to a
256 reduced fat adipose tissue when rats consumed a cocoa diet. On the other hand, there was
257 no difference among the mean colon weights or lengths of any group of animals at the time
258 of killing (data not shown). Furthermore, no pathologic alterations were found among the
259 groups in any organ by gross observation, including liver, lung, and kidney.

260 After H&E staining, sections from AOM control group showed signs of diffuse
261 inflammation with destruction of epithelial architecture and loss of crypts (Fig. 1b). The
262 epithelial crypts were distorted and irregularly distributed in the lamina propria, which
263 contains high numbers of inflammatory cells, including lymphocytes, plasma cells and
264 polymorphonuclear leucocytic cells. The preneoplastic lesions in the epithelial layer of
265 colon mucosa were identified after careful histological examination involving dysplastic
266 aberrant crypts, hypercellularity with enlarged, hyperchromatic nuclei, loss of polarity, and
267 decreased mucine excretion. Treatment with cocoa reduced the morphological alteration
268 associated with AOM administration, protecting the mucosal architecture, reducing crypt
269 and epithelial damage and showing scarce infiltration of inflammatory cells. No
270 histological modification was present in the colon of rats fed with control and cocoa diets.

271

272 *Cocoa enriched diet reduced the colonic expression of COX-2, iNOS and NF-κB*
273 *(p65) induced by AOM*

274 Next, we investigated the effect of cocoa administration in the expression of
 275 inflammatory enzymes COX-2 and iNOS that are often elevated in the initial phase of
 276 carcinogenesis induced by AOM. As shown in Fig. 2a, injection of AOM markedly
 277 elevated the expression of COX-2 and iNOS mRNA in the colon, while cocoa feeding
 278 effectively suppressed this elevation. It is worth noting that cocoa feeding alone was able to
 279 significantly reduce COX-2 expression in non-AOM rats to levels below those of control
 280 non-AOM rats.

281 Given that the expression of both inflammatory proteins is regulated by NF- κ B, the
 282 levels of the p-65 subunit of NF- κ B in the nucleus of the colonocytes (active form) were
 283 then measured. To this end, immunohistochemical staining was performed in the local
 284 colonic tissue. As shown in Fig. 2b, there was little expression of immunoreactive NF- κ B-
 285 p65 in control or cocoa distal colon tissues that was mainly localised in stromal cells. On
 286 the contrary, strong NF- κ B-p65 expression was detected in both epithelial and stromal cells
 287 in colon of control- or cocoa-AOM groups. Nevertheless, the scores for NF- κ B-p65 in
 288 cocoa groups were significantly smaller than those of the AOM control, indicating that
 289 cocoa supplementation significantly reduces the NF- κ B activity in the colonic mucosa.

290

291 *CPE treatment protects TNF α -induced inflammatory markers expression in Caco-2*
 292 *cells*

293 In order to verify if the positive effects of the cocoa diet could be related to its
 294 polyphenol content and to gain further insight into the mechanism involved, we next
 295 investigated the anti-inflammatory activity of a cocoa phenolic extract (CPE) obtained from
 296 the cocoa used in the *in vivo* experiment. To this end, the effects of CPE on intestinal
 297 inflammation were investigated in TNF α -stimulated Caco-2 cells, an *in vitro* model of
 298 experimentally-induced intestinal inflammation. Accordingly, Caco-2 cells were exposed

299 during 24 hours to different concentrations of TNF α and the levels of the pro-inflammatory
 300 marker IL-8 were evaluated. Fig. 3a shows that IL-8 secreted in the culture medium by
 301 Caco-2 cells in response to TNF α augmented in a dose-dependent manner, being
 302 significantly increased at the dose of 40 ng/mL of TNF α . Likewise, the levels of the
 303 inflammatory enzymes COX-2 and iNOs, evaluated by Western blot, were significantly
 304 enlarged in Caco-2 cells after 24 h of stimulation with 40 ng/mL of TNF α (Figs. 3b and c).
 305 To determine whether CPE could reduce these inflammatory responses, Caco-2 cells were
 306 then pre-treated for 20 h with 10 μ g/mL of CPE (which represent a realistic concentration
 307 in the human gut) and further stimulated with TNF α (40 ng/mL) for 24 h. As shown in
 308 Figure 5, pre-treatment of Caco-2 cells with CPE significantly reduced IL-8 release (Fig.
 309 4a) and down-regulated the levels of COX-2 and iNOS in Caco-2 cells stimulated with
 310 TNF α (Figs. 4b and c).

311

312 *CPE regulates NF- κ B and the mitogen-activated protein kinase (MAPK) in Caco-2*
 313 *cells*

314 Finally, to elucidate the mechanism responsible for the anti-inflammatory action of
 315 cocoa polyphenols, we examined the upstream pathways for COX-2 and iNOS stimulation,
 316 which are rapidly activated after TNF α treatment. Accordingly, the nuclear and cytosolic
 317 levels of NF- κ B were evaluated by Western blot. As shown in Figs. 5a and b, stimulation
 318 of Caco-2 cells with TNF α during 60 min increased the accumulation of the p65 subunit of
 319 NF- κ B in the nucleus, while 20 hours pre-treatment of cells with CPE significantly
 320 prevented the TNF α -induced NF- κ B translocation.

321 The induction of NF- κ B by TNF α is partially mediated by members of the mitogen-
 322 activated protein kinase family (MAPK), such as c-Jun NH2-terminal kinases (JNKs),
 323 extracellular signal regulated kinases (ERKs) and p38. Then, we determined the activation

324 of these MAPKs by TNF α by measuring the levels of phosphorylated, JNKs, ERKs and
325 p38. As shown in Figs. 5c and d, all MAPKs were strongly activated upon 60 min of
326 TNF α stimulation. CPE pre-treatment did not block ERKs and p38 activation but strongly
327 inhibited activation of JNKs. In addition, 20 hours of CPE treatment induced ERKs and
328 p38 activation in Caco-2 cells.
329

330 **Discussion**

331 The present study was performed to investigate the potential anti-inflammatory effect
332 of cocoa polyphenols and to elucidate the molecular mechanism involved. In a previous
333 study we demonstrated that a cocoa-rich diet could prevent the early stage of CRC⁽¹⁵⁾. The
334 chemo-preventive effects elicited by cocoa were due at least in part to its ability to prevent
335 oxidative stress and cell proliferation and to induce apoptosis. Herein we show for the first
336 time that cocoa flavonoids also prevent colon inflammation in azoxymethane-treated rats
337 and in TNF- α -stimulated Caco-2 cells, which contribute to its anti-carcinogenic activity.

338 The AOM colon cancer model has been extensively used to examine the chemo-
339 preventive effect of numerous compounds on CRC⁽²⁰⁾. Administration of the colon specific
340 carcinogen AOM to rodents induce oxidative stress and inflammation that results in
341 chromosomal instability and DNA damage in proliferating cells contributing to malignant
342 transformation⁽²¹⁾. In the present study, we show that feeding animals with a cocoa-rich diet
343 strongly prevents inflammatory tissue damage and cellular infiltration in the colonic
344 mucosa. This result is in concordance with previous reports indicating that some
345 polyphenolic compounds including genistein⁽²²⁾, limonin⁽²³⁾, and silibinin⁽²⁴⁾ possess anti-
346 inflammatory effects *in vivo* on the colonic tissue. More importantly, two single doses of a
347 cocoa polyphenolic extract reduced colon damage and neutrophil infiltration in an acute
348 model of dextran sulfate sodium (DSS)-induced ulcerative colitis in mice⁽²⁵⁾. Indeed, we
349 have recently shown that a cocoa rich-diet prevents the development of colonic
350 preneoplastic lesions (ACF) induced by AOM⁽¹⁵⁾; therefore, we suggest that the reduction
351 of intestinal inflammation by cocoa could be partly related to the prevention of early steps
352 of colon carcinogenesis.

353 The anti-inflammatory activity of a cocoa diet was thus investigated as one of the
354 mechanisms of its efficacy in inhibiting AOM-induced ACF formation in the rat colon. We

355 found that a cocoa-rich diet markedly inhibited the expression of enzymes associated with
 356 inflammation, such as iNOS and COX-2, which are increased both in human CRC and in
 357 AOM-induced rat colon carcinogenesis⁹. Increased expression of iNOS and, to a lesser
 358 extend, of COX-2 occurred early in AOM-induced colon carcinogenesis in rats⁽²⁶⁾. iNOS
 359 expression is frequently observed in dysplastic, but not in hyperplastic, ACF indicating that
 360 iNOS plays an important role in the early stages of tumour formation⁽²⁶⁾. On the other hand,
 361 tumorigenic mechanisms of COX-2 include inhibition of apoptosis via increased Bcl-2 and
 362 activation of proliferation via mitogen-activated protein kinase or phosphoinositide 3-
 363 kinase-AKT signalling pathways⁽²⁷⁾. More importantly, the effect of cocoa-rich diet
 364 preventing iNOS and COX-2 expression induced by AOM is consistent with our previous
 365 report showing that cocoa-rich diet both prevents the increase in proliferation evoked by
 366 AOM and induces apoptosis⁽¹⁵⁾. Therefore, as previously described by other naturally
 367 occurring phytochemicals⁽¹¹⁾, the reduction in pro-inflammatory mediators iNOS and COX-
 368 2 in association with the inhibition of ACF formation suggests that cocoa-rich diet is
 369 effective for primary prevention of inflammation-related carcinogenesis in rat colon.

370 One of the most important anti-inflammatory activities of some phenolic compounds
 371 is their ability to modulate the activation of nuclear factor NF- κ B^(11,28). NF- κ B is
 372 considered as an important transcription factor in the tumorigenic process because its
 373 constitutive activation exerts strong proliferative and anti-apoptotic functions in cancer
 374 cells⁽³⁾. In resting cells, NF κ B is sequestered in the cytoplasm by interaction with
 375 inhibitors, such as I κ B and related proteins. In response to stimulation, I κ B is
 376 phosphorylated, ubiquitinated and degraded, allowing NF- κ B dimers (p65 and p50) to
 377 translocate to the nucleus for promoting transcription of target genes including pro-
 378 inflammatory enzymes iNOS and COX-2⁽²⁹⁾. Interestingly, the results of the present study
 379 showed that the increased levels of NF- κ B (p65) in the nucleus of epithelial colonic cells of

380 AOM-treated rats were significantly decreased by cocoa diet, suggesting that the inhibitory
381 effects of cocoa diet on COX-2 and iNOS expression may be mediated by the inhibition of
382 NF- κ B activation. These findings are consistent with other studies showing that natural
383 chemo-preventive agents suppress both iNOS and COX-2 levels by regulating NF- κ B
384 signalling^(30,31). Overall, suppression of NF- κ B signalling by cocoa-rich diet seems to
385 contribute to the reduction in AOM-induced formation and development of colonic ACF in
386 rats.

387 In response to oxidative and pro-inflammatory stimuli, NF- κ B is activated, at least in
388 part, by a series of upstream kinases, including those belonging to the MAPK-family
389 proteins, such as ERKs, JNKs and p38 MAPK. Recent *in vitro* studies have demonstrated
390 that cocoa phenolic compounds can regulate several signal transduction pathways^(32,33) and
391 transcription factors^(34,35) and thus modulate the expression of specific genes to exert its
392 function⁽³⁶⁾. In the present study, we confirmed that a CPE obtained from the same cocoa
393 used in the *in vivo* study significantly reduced the increase in inflammatory markers such as
394 IL-8 secretion, COX-2 and iNOS expression induced by the pro-inflammatory agent TNF- α
395 in Caco-2 cells. In addition, we showed that CPE selectively reduced both the
396 phosphorylation of JNKs and the nuclear translocation of NF- κ B induced by TNF- α ,
397 indicating that this pathway could be an important mechanism contributing to the reduction
398 of intestinal inflammation associated with cocoa feeding. Similar results have been found
399 in previous reports indicating that several natural compounds could contribute to the
400 inhibition of inflammation by blocking MAPK signalling and NF- κ B⁽¹¹⁾. More importantly,
401 it has been recently demonstrated that JNKs inhibition could prevent inflammatory process
402 and then inflammatory bowel disease⁽³⁷⁾. Altogether, the mechanisms by which cocoa
403 polyphenols reduced the expression of inflammatory markers seem to be partly due to their
404 ability to inhibit JNKs phosphorylation and NF- κ B activation.

405 It is interesting to note that for many individuals, cocoa products constitute a larger
406 proportion of the diet than foods containing bioactive compounds with similar properties
407 such as green tea, wine, or soy beans. Indeed, as compared to other flavonoid containing
408 foods, cocoa products exhibit a high concentration of procyanidins that are poorly absorbed
409 in the intestine and consequently their beneficial effects would be restricted to the
410 gastrointestinal tract where they may have an important antioxidant and anti-inflammatory
411 local function⁽³⁸⁾.

412 In summary, the present study shows that cocoa polyphenols posses a potent anti-
413 inflammatory effect *in vivo* and *in vitro* on the colonic tissue. At the molecular level, the
414 inhibition of JNKs/MAPK and NF-κB activation and the down regulation of iNOS and
415 COX-2 expression seem to play an important role in the prevention of intestinal
416 inflammation. Therefore, together with their inherent antioxidant effects, cocoa
417 polyphenols are able to reduce colon inflammation as a complementary mechanism of
418 chemo-prevention in the early stages of chemical carcinogen-induced colonic ACF
419 formation and development. Taken together, our data provide evidence that cocoa
420 polyphenols would offer a natural therapeutic approach to improve individual health status
421 including prevention of intestinal inflammation with minimal toxicity.

422

423

424 **Acknowledgements**

425 This work was supported by the grant AGL2007-64042/ALI and project CSD 2007-
426 00063 from Programa Consolider-Ingenio from the Spanish Ministry of Science and
427 Innovation (CICYT). I. Rodríguez-Ramiro is a predoctoral JAE-Predoc fellow of the
428 Consejo Superior de Investigaciones Científicas co-funded by the European Social Fund.
429 M.A. Martín is affiliated to CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas
430 (CIBERDEM), ISCIII, Madrid, Spain.

431 The authors' contributions were as follows: M. A. M. designed the research; I. R.-R.,
432 S. R., L. G. and M. A. M., conducted the animal trial; I. R.-R., S. R., L. G., L. B., M. A. M.,
433 E. L.-O. and A. A-T analyzed and interpreted the data; S. R., L. G., and L. B. critical
434 revised and final approved; L. B. obtained the funding. M. A. M. wrote the paper. None of
435 the authors has any conflict of interest.

436

References

1. Jemal A, Siegel R, Ward E *et al.* (2009). Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin.* **59**, 225-249
2. Pritchard CC & Grady WM (2011). Colorectal cancer molecular biology moves into clinical practice. *Gut.* **60**, 116-129
3. Maeda S & Omata M (2008) Inflammation and cancer: role of nuclear factor-kappaB activation. *Cancer Sci.* **99**, 836-842
4. Takahashi M & Wakabayashi K (2004). Gene mutations and altered gene expression in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rodents. *Cancer Sci.* **95**, 475–480
5. Itzkowitz SH & Yio X (2004). Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **287**, G7–G17
6. Kashfi K (2009). Anti-inflammatory agents as cancer therapeutics. *Adv Pharmacol.* **57**, 31-89.
7. Luo JL, Maeda S, Hsu LC *et al.* (2004). Inhibition of NF-kappaB in cancer cells converts inflammation- induced tumor growth mediated by TNFalpha to TRAIL-mediated tumor regresión. *Cancer Cell.* **6**, 297-305.
8. Gossiau A, Li S, Ho C-T *et al.* (2011). The importance of natural product characterization in studies of their anti-inflammatory activity. *Mol Nutr Food Res.* **55**, 74–82.
9. Half E & Arber N (2009). Colon cancer: Preventive agents and the present status of chemoprevention. *Expert Opin Pharmacother.* **10**, 211–219.
10. Santangelo C, Vari R, Scazzocchio B *et al.* (2007). Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. *Ann Ist Super Sanita.* **43**, 394-405.

- 461 11. Pan M-H, Lai Ch-S, Wu J-Ch *et al.* (2011). Molecular mechanisms for
 462 chemoprevention of colorectal cancer by natural dietary compounds. *Mol Nutr Food*
 463 *Res.* **55**, 32–45.
- 464 12. Kang NJ, Lee KW, Lee D *et al.* (2008). Cocoa procyanidins suppress
 465 transformation by inhibiting mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem.*
 466 **283**, 20664-20673.
- 467 13. Kim JE, Son JE, Jung SK *et al.* (2010). Cocoa polyphenols suppress TNF- α -
 468 induced vascular endothelial growth factor expression by inhibiting phosphoinositide
 469 3-kinase (PI3K) and mitogen-activated protein kinase kinase-1 (MEK1) activities in
 470 mouse epidermal cells. *Br J Nutr.* **104**, 957-964.
- 471 14. Vinson JA, Proch J, Bose P *et al.* (2006). Chocolate is a powerful ex vivo and in
 472 vivo antioxidant, an antiatherosclerotic agent in an animal model, and a significant
 473 contributor to antioxidants in the European and American Diets. *J Agric Food Chem.*
 474 **54**, 8071-8076.
- 475 15. Rodríguez-Ramiro I, Ramos S, López-Oliva E *et al.* (2011). Cocoa-rich diet
 476 prevents azoxymethane-induced colonic preneoplastic lesions in rats by restraining
 477 oxidative stress and cell proliferation and inducing apoptosis. *Mol Nutr Food Res.* **55**,
 478 1895-1899.
- 479 16. Erlejman AG, Jaggers G, Fraga CG *et al.* (2008). TNFa-induced NF- κ B activation
 480 and cell oxidant production are modulated by hexameric procyanidins in Caco-2 cells.
 481 *Arch Biochem Biophys.* **476**, 186–195
- 482 17. Martín MA, Ramos S, Mateos R *et al.* (2008). Protection of human HepG2 cells
 483 against oxidative stress by cocoa phenolic extract. *J Agri Food Chem.* **56**, 7765-7772.

- 484 18. Matsui N, Ito R, Nishimura E *et al.* (2005). Ingested cocoa can prevent high-fat
 485 diet-induced obesity by regulating the expression of genes for fatty acid metabolism.
 486 *Nutrition*. **21**, 594–601
- 487 19. Ramiro-Puig E, Pérez-Cano FJ, Ramos-Romero S *et al.* (2008). Intestinal immune
 488 system of young rats influenced by cocoa-enriched diet. *J Nutr Biochem*. **19**, 555–565
- 489 20. Reddy BS (2004). Studies with the azoxymethane-rat preclinical model for
 490 assessing colon tumor development and chemoprevention. *Environ Mol Mutagen*. **44**,
 491 26-35.
- 492 21. Miller PE, Lesko SM, Muscat JE *et al.* (2010). Dietary patterns and colorectal
 493 adenoma and cancer risk: a review of the epidemiological evidence. *Nutr Cancer*. **62**,
 494 413-424
- 495 22. Seibel J, Molzberger AF, Hertrampf T *et al.* (2009). Oral treatment with genistein
 496 reduces the expression of molecular and biochemical markers of inflammation in a rat
 497 model of chronic TNBS-induced colitis. *Eur J Nutr* **48**, 213–220
- 498 23. Vanamala J, Leonardi T, Patil BS *et al.* (2006). Suppression of colon
 499 carcinogenesis by bioactive compounds in grapefruit. *Carcinogenesis*. **27**:1257–65
- 500 24. VelmuruganB, Singh RP, Tyagi A *et al.* (2008). Inhibition of azoxymethane-
 501 induced colonic aberrant crypt foci formation by silibinin in Male Fisher 344 Rats.
 502 *Cancer Prev Res*. **1**, 376–384
- 503 25. Andújar I, Recio MC, Giner RM *et al.* (2011). Inhibition of ulcerative colitis in
 504 mice after oral administration of a polyphenol-enriched cocoa extract is mediated by
 505 the inhibition of STAT1 and STAT3 phosphorylation in colon cells. *J Agric Food*
 506 *Chem*. **59**, 6474-6483.
- 507 26. Takahashi M, Mutoh M, Kawamori T, Sugimura T and Wakabayashi K (2000).
 508 Altered expression of beta-catenin, inducible nitric oxide synthase and

- 509 cyclooxygenase-2 in azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis.
510 *Carcinogenesis*. **21**, 1319-1327.
- 511 27. Terzic J, Grivennikov S, Karin E *et al.* (2010) Inflammation and Colon Cancer.
512 *Gastroenterology*. **138**, 2101–2114
- 513 28. Romier B, Van De Walle J, During A, *et al.* (2008) Modulation of signalling
514 nuclear factor-kB activation pathway by polyphenols in human intestinal Caco-2
515 cells. *Br J Nutr* **100**, 542–551
- 516 29. Surh YJ, Chun KS, Cha HH *et al.* (2001). Molecular mechanisms underlying
517 chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of
518 COX-2 and iNOS through suppression of NF-kappa B activation. *Mutat Res*. **481**,
519 243–68.
- 520 30. Velmurugan B, Singh RP, Agarwal R *et al.* (2010). Dietary-feeding of grape seed
521 extract prevents azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci formation in
522 Fischer 344 rats. *Mol Carcinogen*. **49**, 641–652
- 523 31. Lai Ch-S, Tsai M-L, Cheng A-Ch *et al.* (2011). Chemoprevention of colonic
524 tumorigenesis by dietary hydroxylated polymethoxyflavones in azoxymethane treated
525 mice. *Mol Nutr Food Res*. **55**, 278–290
- 526 32. Martín MA, Serrano AB, Ramos S *et al.* (2010). Cocoa flavonoids up-regulate
527 antioxidant enzyme activity via the ERK1/2 pathway to protect against oxidative
528 stress-induced apoptosis in HepG2 cells. *J Nutr Biochem*. **21**, 196-205
- 529 33. Rodríguez-Ramiro I, Ramos S, Bravo L *et al.* (2011). Procyanidin B2 and a cocoa
530 polyphenolic extract inhibit acrylamide-induced apoptosis in human Caco-2 cells by
531 preventing oxidative stress and activation of JNK pathway. *J Nutr Biochem*. **22**,
532 1186-1194.

- 533 34. Granado-Serrano AB, Martín MA, Haegeman G *et al.* (2010). Epicatechin
 534 induces NF-kappaB, activator protein-1 (AP-1) and nuclear transcription factor
 535 erythroid 2p45-related factor-2 (Nrf2) via phosphatidylinositol-3-kinase/protein
 536 kinase B (PI3K/AKT) and extracellular regulated kinase (ERK) signalling in HepG2
 537 cells. *Br J Nutr.* **103**, 168-179.
- 538 35. Rodríguez-Ramiro I, Ramos S, Bravo L *et al.* (2012). Procyanidin B2 induces
 539 Nrf2 translocation and glutathione S-transferase P1 expression via ERKs and p38-
 540 MAPK pathways and protect human colonic cells against oxidative stress. *Eur J Nutr.*
 541 DOI 10.1007/s00394-011-0269-1
- 542 36. Rodríguez-Ramiro I, Martín MA, Ramos S *et al.* (2011). Comparative effects of
 543 dietary flavanols on antioxidant defences and their response to oxidant-induced stress
 544 on Caco2 cells. *Eur J Nutr.* **50**, 313-22.
- 545 37. Mitsuyama K, Suzuki A, Tomiyasu N *et al.* (2006). Proinflammatory signalling
 546 by Jun-N-terminal kinase in inflammatory bowel disease. *Int J Mol Med.* **17**, 449–55.
- 547 38. Ramiro-Puig E & Castell M (2009). Cocoa: antioxidant and immunomodulator.
 548 *Brit J Nutr.* **101**, 931–940
- 549
- 550

Figure Captions

Fig. 1 (a) Experimental design for AOM-induced colon carcinogenesis in rats. (b)

Representative haematoxylin and eosin stained sections of colon of rats injected with saline or AOM and fed with control or cocoa enriched diet are shown (100X)

Fig. 2 Effect of cocoa enriched diet on the colonic expression of COX-2, iNOS and

NF- κ B induced by AOM. (a) Representative RT-PCR analysis and percent values of mRNA levels of COX-2 and iNOS in distal colon mucosa of rats injected with saline or AOM and fed with control or cocoa enriched diet. (b) Representative photographs for immunohistochemical staining of NF- κ B subunit p65 (dark brown) positive cells (400X magnification) and percentage score in colon tissues from rats injected with saline or AOM and fed control or cocoa enriched diet. Bars represent mean \pm SD value from 6-8 rats in each group. Means without a common letter differ, $P < 0.05$.

Fig. 3 Effect of TNF α on IL-8 secretion and COX-2 and iNOS expression in Caco-2

cells. (a) Cells were treated with 10, 20 and 40 ng/mL TNF α for 24 hours and IL-8 secretion was evaluated by ELISA. (b) Cells were treated with 40 ng/mL TNF α for 24 hours and COX-2 and iNOS levels were evaluated by Western blot (means \pm SD). Representative bands of 3 different experiments. (c) Percentage values of COX-2 and iNOS levels relative to the control condition (means \pm SD). Means without a common letter differ, $P < 0.05$

Fig. 4 Effect of CPE treatment in TNF α -induced IL-8 secretion and COX-2 and iNOS

expression in Caco-2 cells. C: control, untreated cells; TNF: cells treated with 40 ng/mL TNF α for 24 h; CPE: cells treated with 10 μ g/mL CPE for 20 h; CPE+TNF: cells pre-

576 treated with 10 µg/mL CPE for 20 h and then treated with 40 ng/mL TNFα for 24 h. (a) IL-
 577 8 secretion was evaluated by ELISA. (b) COX-2 and iNOS levels were evaluated by
 578 Western blot. Representative bands of 3 different experiments. (c) Percentage values of
 579 COX-2 and iNOS levels relative to the control condition (means ± SD). Means without a
 580 common letter differ, $P < 0.05$

581

582 **Fig. 5** Effect of CPE on NF-κB translocation and phosphorylated levels of ERKs,
 583 JNKs and p38 induced by TNFα in Caco-2 cells. C: control, untreated cells; TNF: cells
 584 treated with 40 ng/mL TNFα for 1 h; CPE: cells treated with 10 µg/mL CPE for 20 h;
 585 CPE+TNF: cells pre-treated with 10 µg/mL CPE for 20 hours and then treated with 40
 586 ng/mL TNFα for 1 h. NF-κB levels were determined by Western blot in the nuclear or
 587 cytosolic cellular compartment. (a) Representative bands of 3 different experiments. (b)
 588 Percentage values of nuclear and cytosolic NF-κB levels relative to the control condition
 589 (means ± SD). Phosphorylated and total levels of ERKs, JNKs and p38 were determined by
 590 Western blot analysis using phospho- and total-specific antibodies. (c) Bands are
 591 representative of 2-3 different experiments. (d) Percentage values of the p-ERKs/ERKs, p-
 592 JNKs/JNKs and p-p38/p38 ratios relative to the control condition (means ± SD) are shown.
 593 Means without a common letter differ, $P < 0.05$

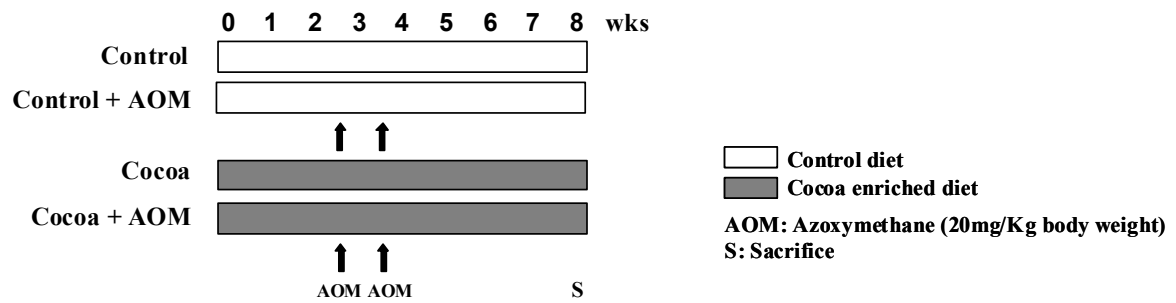
594

Table 1. Composition of the experimental control and cocoa-rich diets

Component (g/Kg dry weight)	Control	Cocoa
Casein	140	140
Dextrose	155	155
Sucrose	100	100
Fat	40	40
t-BHQ (<i>tert</i> -butylhydroquinone)	0.008	0.008
Mineral mix.	35	35
Vitamin mix.	10	10
L-Cys	1.8	1.8
Cholin bitartrate	2.5	2.5
Cellulose	100	59.2
Starch	415.7	336.5
Cocoa powder	-	120

Figure 1

a)



b)

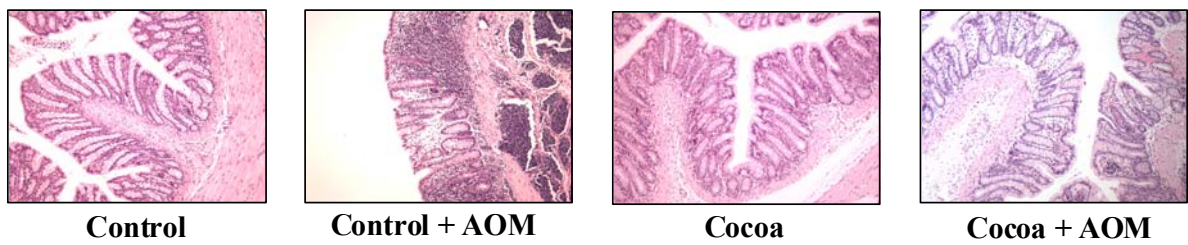


Figure 2

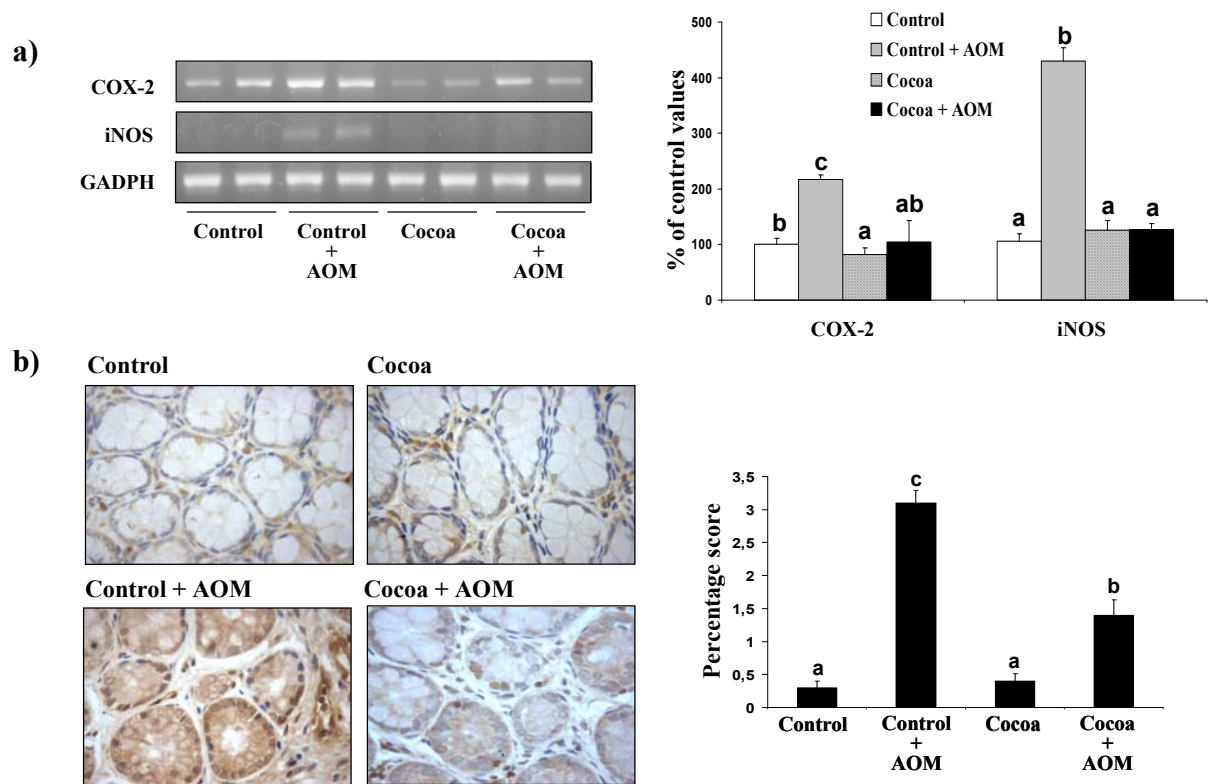


Figure 3

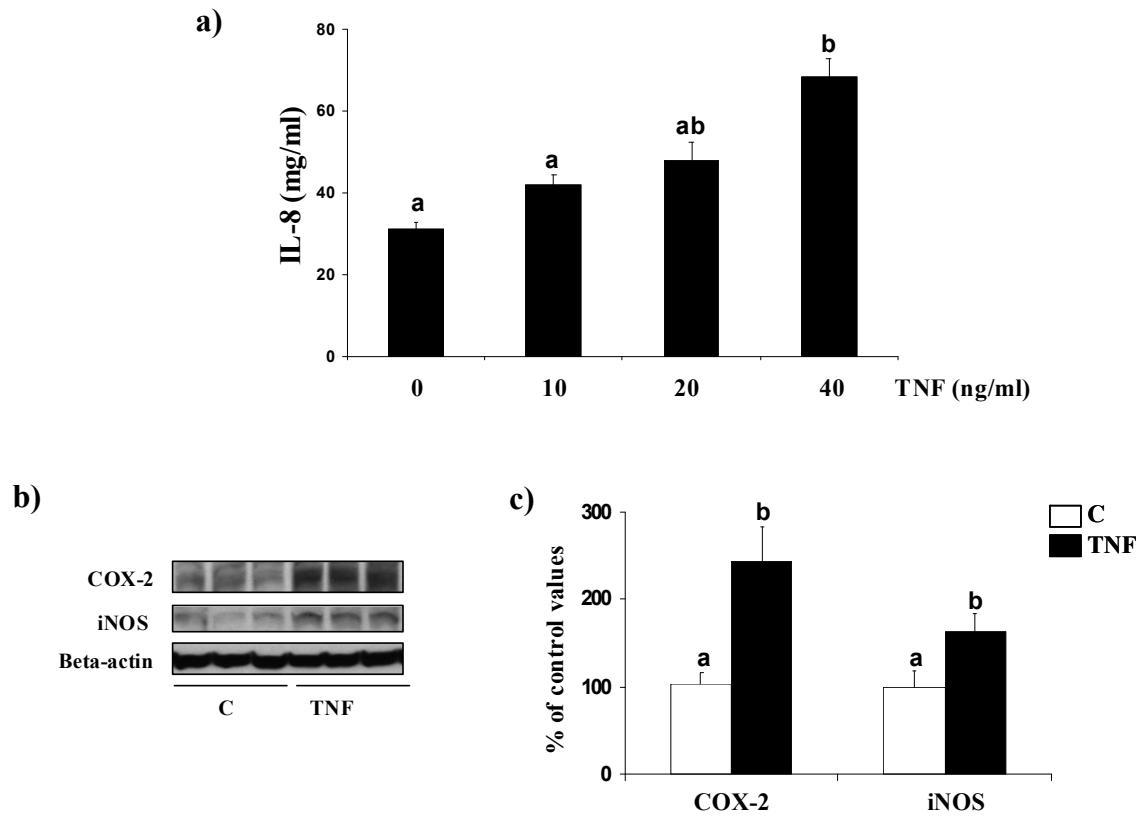


Figure 4

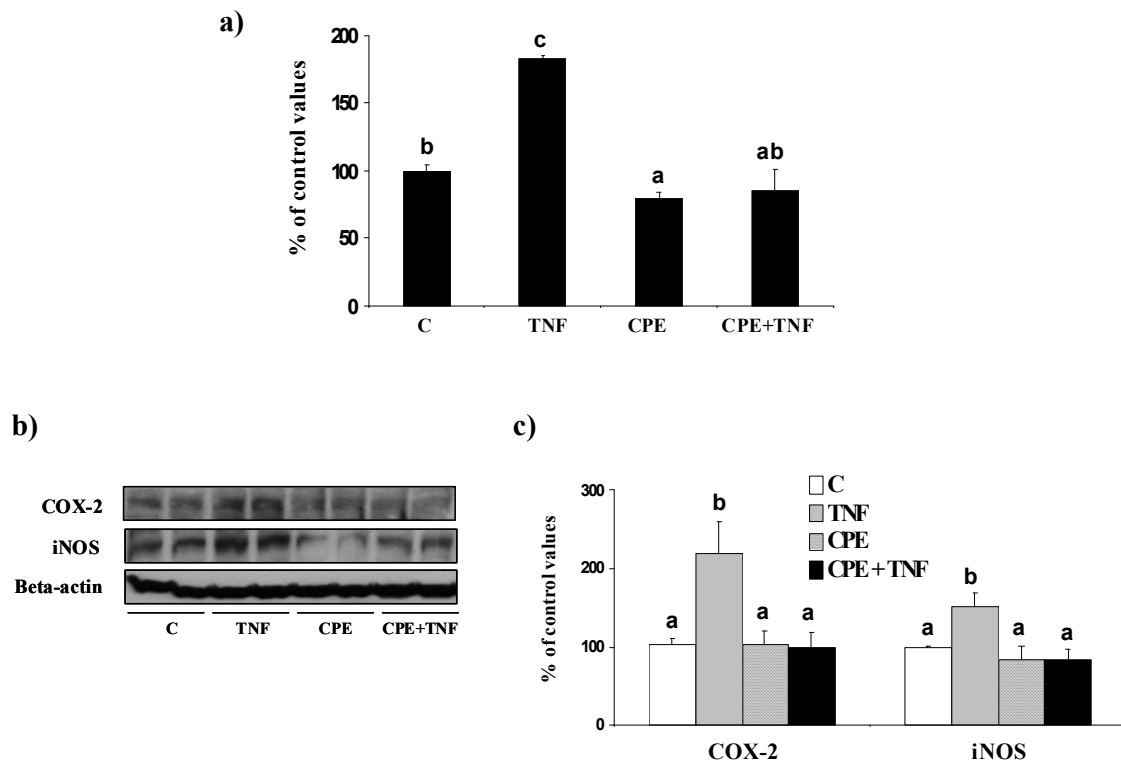
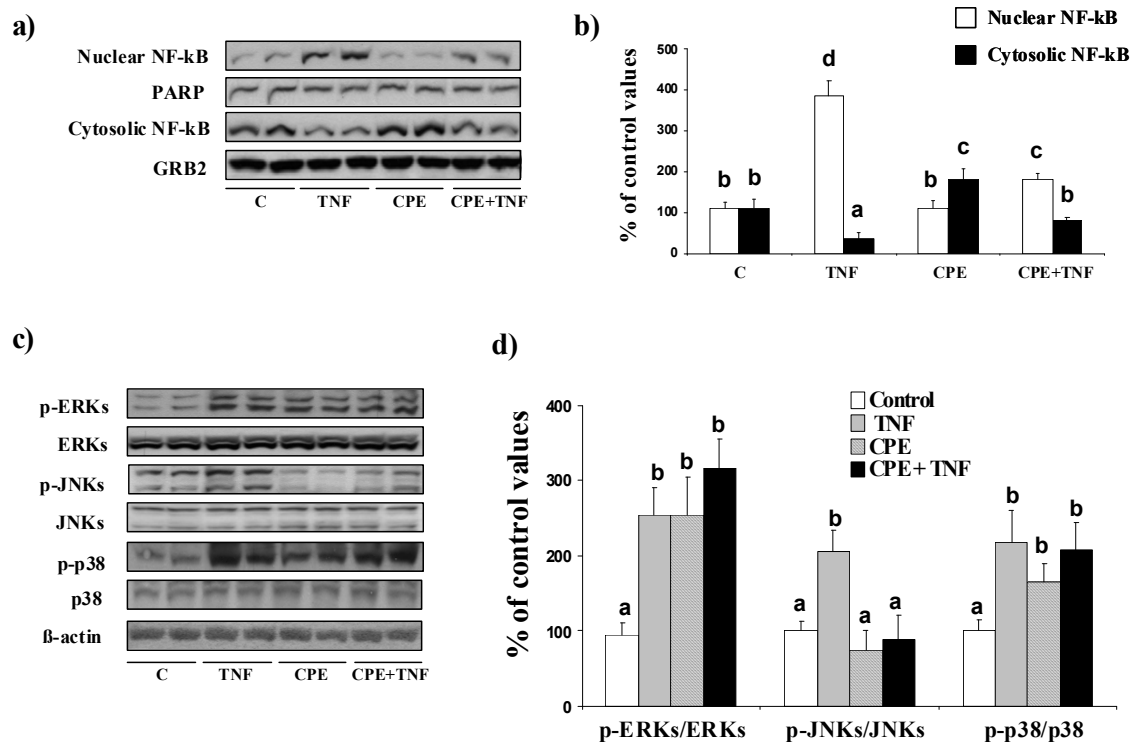


Figure 5



Discusión

1. Efecto de los flavonoides mayoritarios del cacao en la protección intestinal en un modelo de estrés oxidativo en células intestinales Caco-2

En la última década, se ha producido una extensa investigación sobre las propiedades quimiopreventivas de los polifenoles de la dieta. En concreto, un grupo de polifenoles, denominados flavanoles han sido descritos como potentes antioxidantes¹⁶⁵ que además pueden interaccionar con las vías de señales celulares, modulando la regulación y la expresión de genes¹⁵². El cacao se caracteriza por presentar un alto contenido en procianidinas, un tipo de flavanoles de estructura compleja y de alto peso molecular con una limitada absorción intestinal (revisado en Fraga & Oteiza, 2011⁹³). No obstante, a pesar de que muchos de los flavonoides mayoritarios del cacao llegan inalterados al colon, son pocos los estudios que han investigado las propiedades beneficiosas del cacao en el intestino.

Los flavanoles del té verde, como la ECG y la EGCG posiblemente sean algunos de los polifenoles más estudiados en ensayos de quimiopreención¹⁶⁶. Dada su demostrada eficacia, se realizó un estudio comparativo del efecto protector frente al estrés oxidativo entre estos flavanoles del té y los principales flavanoles del cacao, la EC y la PB2 en las células intestinales Caco-2. Por tanto, este estudio comparativo constituye una de las primeras evidencias de la potencial actividad biológica de los principales fenoles del cacao en el intestino.

La estructura química confiere a los compuestos fenólicos una importante capacidad para neutralizar los compuestos oxidantes. Ello se debe a la facilidad de estas estructuras químicas para donar hidrógenos y a la estabilidad de los radicales fenoxilos que forman por interacción directa con los ROS¹⁶⁵. En este sentido, se observó que la PB2 presentaba una capacidad de neutralización de radicales libres semejante a la de la ECG y la EGCG, descritos como potentes antioxidantes. Estos resultados, sugieren que posiblemente la procianidina del cacao, puede desempeñar efectos antioxidantes en las células intestinales de forma similar a otros compuestos naturales descritos previamente.

En los resultados de efecto directo sobre la línea celular Caco-2, se encontró que existía una relación entre los efectos obtenidos en los cultivos celulares a dosis fisiológicas (10 μ M) y los resultados del ensayo de capacidad antioxidante a esta misma dosis. Así, cuando las células fueron tratadas directamente con ECG, EGCG y PB2 se observó una reducción significativa en los niveles basales de la generación de los ROS. Sin embargo, en el caso de la EC la reducción en los niveles basales de ROS fue menor en comparación con los otros tres compuestos. Estos resultados están de acuerdo con los

mostrados por Alía y colaboradores, 2006¹⁶⁷ en los que se indicaba que ciertos compuestos fenólicos producían una disminución en la producción de los ROS contribuyendo a prevenir o retrasar el estrés oxidativo celular.

El glutatión y las enzimas relacionadas con él son uno de los mecanismos de defensa antioxidante principales para controlar el equilibrio redox en la mucosa intestinal⁵⁷. En los estudios realizados en Caco-2 se comprobó que los flavanoles utilizados mantenían intactas las reservas del GSH intracelular encargadas de prevenir el estrés oxidativo celular. Además, el tratamiento directo de la PB2 sobre las células Caco-2 provocó un aumento significativo dosis-dependiente en las actividades de las enzimas antioxidantes/detoxificantes GPx, GR y GST. Estos resultados están de acuerdo con estudios previos en los que se ha demostrado que un extracto polifenólico de cacao induce un aumento de estas tres enzimas en la línea celular HepG2¹³². Posteriormente, Pereira-Caro y colaboradores, 2011¹⁶⁸ han apoyado estos resultados, demostrando que otros compuestos antioxidantes, como los derivados del aceite de oliva, también refuerzan las defensas antioxidantes en las células HepG2. Por tanto, los resultados obtenidos sugieren que la PB2 refuerza la actividad de las defensas antioxidantes, mejorando así las condiciones fisiológicas de las células para hacer frente a posibles daños o al estrés oxidativo producido por tóxicos de la dieta.

El estrés oxidativo no solo induce daños celulares a través del daño a proteínas, lípidos y ADN. También puede alterar vías de señales sensibles a cambios redox implicadas en la respuesta de la apoptosis. En este sentido, los ROS pueden ser los desencadenantes del proceso apoptótico³⁸. En estudios previos, se ha demostrado que el *t*-BOOH es un potente agente pro-oxidante celular y su incubación con las células de cultivo constituye un modelo de estrés oxidativo fácilmente reproducible^{132,167}. Por ello, el *t*-BOOH se utiliza para evaluar el efecto protector de los compuestos naturales de la dieta, frente al estrés oxidativo^{132,167}. De esta manera, aquellos compuestos que previenen el efecto del *t*-BOOH son considerados como protectores frente al estrés oxidativo. De acuerdo con estos estudios, las células Caco-2 fueron incubadas con una dosis de 400 μ M de *t*-BOOH observándose una activación de la caspasa-3, que alcanzó su pico máximo a las 4 horas de tratamiento con el pro-oxidante. Previamente, Martín y colaboradores, 2010¹³² demostraron que el pre-tratamiento de las células HepG2 con un extracto polifenólico de cacao prevenía la citotoxicidad inducida por el *t*-BOOH, reduciendo el aumento de ROS y la posterior activación de la caspasa-3. Con la misma finalidad, se investigó el efecto protector de estos cuatro flavanoles frente al estrés

oxidativo en la línea celular Caco-2. Así, se vio que la EC era la que mostraba la menor capacidad quimiopreventiva, para reducir el estrés oxidativo producido por el aumento de los ROS, así como para evitar la muerte celular inducida por la activación de la caspasa-3 en la línea celular Caco-2. El resto de los flavanoles, previnieron la producción de ROS y la muerte celular a los tiempos estudiados, pero sólo la PB2 consiguió evitar completamente la activación de la caspasa-3.

En resumen, los flavanoles evaluados ejercieron un efecto protector en la línea celular Caco-2 frente al daño oxidativo y la muerte celular inducidos por el *t*-BOOH. Este efecto se asoció con su capacidad antioxidante, que disminuía la generación de los ROS y prevenía, o al menos retrasaba, la activación de la caspasa-3 inducida por el estrés oxidativo ocasionado por el *t*-BOOH. En concreto, la PB2 protegió a las células Caco-2 al menos por dos mecanismos distintos: a través de su capacidad de captar y neutralizar ROS y mediante su capacidad de aumentar la actividad de las defensas endógenas antioxidantes. Finalmente este estudio indica que la principal procianidina del cacao, la PB2, parece tener un efecto protector superior a otros antioxidantes de la dieta de reconocida eficacia quimiopreventiva, sugiriendo los posibles efectos beneficiosos de los polifenoles del cacao en el epitelio intestinal.

2. Mecanismos moleculares de protección de los flavonoides del cacao frente al estrés oxidativo inducido por un tóxico alimentario en células intestinales Caco-2

Con los alimentos se ingieren carcinógenos y sustancias tóxicas que pueden producir estrés oxidativo en la superficie luminal del epitelio intestinal, contribuyendo al origen de diversas patologías intestinales. Hasta ahora se ha comprobado que los flavonoides del cacao son capaces de proteger a las células intestinales Caco-2 del estrés oxidativo producido por un potente agente pro-oxidante. Sin embargo, aún no se ha determinado el potencial efecto protector de estos polifenoles frente a los diferentes tóxicos que pueden estar presentes en los alimentos. De acuerdo con ello, en este trabajo se investigó la capacidad de los polifenoles del cacao para proteger a las células intestinales frente a la toxicidad inducida por un tóxico alimentario como la acrilamida y los mecanismos de acción molecular implicados en esta protección intestinal.

2.1 La acrilamida induce estrés oxidativo y apoptosis en las células intestinales Caco-2

La acrilamida es un tóxico alimentario que se forma durante el tratamiento térmico de alimentos ricos en ciertos aminoácidos, en especial la asparragina en combinación con azúcares reducidos¹⁵⁹. La acrilamida es una amida con un grupo vinilo con una alta afinidad electrónica. Debido a esta característica electrofílica, este tóxico alimentario puede interactuar con las macromoléculas biológicas produciendo efectos nocivos para la célula¹⁶⁹. De hecho, se ha demostrado recientemente que una ingesta continuada de patatas fritas, una de las principales fuentes de acrilamida, aumenta la generación de ROS en los leucocitos e induce un estado pro-inflamatorio generalizado¹⁷⁰. Por otro lado, existen evidencias que indican que la acrilamida puede producir apoptosis en cultivos celulares y en animales de experimentación¹⁷¹⁻¹⁷². Por tanto, los estudios mencionados sugieren que existe una relación entre el estrés oxidativo y el daño celular en presencia de dicho tóxico.

El glutatión es imprescindible en el mantenimiento del estado redox celular⁵⁷. En este sentido, ciertos estudios han mostrado que el tratamiento con la acrilamida produce una disminución del GSH celular, que contribuye a crear una situación de estrés oxidativo en la línea hepática celular HepG2¹⁷³ y en los macrófagos humanos¹⁷⁰. De acuerdo con estos estudios, nuestros resultados mostraron una importante disminución del GSH celular y una sobreproducción de ROS cuando las células Caco-2 fueron tratadas con acrilamida. Además, se advirtió que el desequilibrio redox producido por el tratamiento con la acrilamida precedía a la activación de la caspasa-3, efectora principal del proceso de apoptosis. Así, se sugirió una secuencia temporal en la que la acrilamida debía de producir una disminución del GSH, una sobreproducción de ROS y posteriormente la activación de la caspasa-3 para finalmente producir la muerte celular por apoptosis. Dicha secuencia temporal quedó confirmada por un ensayo de pre-tratamiento realizado con un potente precursor del GSH, la N-acetilcisteína (NAC). Los resultados demostraron que a través de la inhibición de la disminución del GSH se evitaba la citotoxicidad y la apoptosis inducida por la acrilamida. De esta forma, estos estudios refuerzan la importancia de la pérdida del GSH celular en la activación de los procesos de apoptosis, tanto en células intestinales como en otras líneas celulares¹⁷⁴⁻¹⁷⁵.

Diversos estudios han demostrado que la acrilamida produce apoptosis tanto en el sistema nervioso de ratas, como en células neuronales en cultivo¹⁷⁶⁻¹⁷⁷. Sin embargo, el modo de acción a través del cual la acrilamida produce este efecto apoptótico aún no

está claro. Uno de los posibles mecanismos podría ser la activación de las vías de señales implicadas en el proceso de apoptosis. En este sentido numerosas investigaciones señalan que durante las situaciones de estrés, las vías de las MAPKs intervienen en la regulación de la apoptosis⁵⁰. Por ejemplo, Zhou y colaboradores, 2005¹⁷⁸ han mostrado que el aumento de la generación de ROS producido durante una situación de estrés oxidativo modula las vías de las ERKs y de las JNKs MAPKs activando el proceso apoptótico en las células intestinales. En los resultados obtenidos con las células intestinales Caco-2 se observó que de forma posterior al aumento de la generación de ROS, la acrilamida producía una activación rápida pero transitoria en la vía de las ERKs y una activación sostenida de las JNKs. De forma general, mientras que la activación de las ERKs se relaciona con supervivencia celular, la activación persistente de las JNKs ha demostrado ser un acontecimiento ampliamente ligado con el proceso de la apoptosis^{38,50}. Con la finalidad de determinar la implicación de la acrilamida en la modulación de las MAPKs, se realizaron varios ensayos de pre-tratamiento con los inhibidores de dichas vías. Así, se vio que el inhibidor específico de las JNKs prevenía el incremento de la actividad caspasa-3 y la posterior muerte celular inducida por la acrilamida en las células Caco-2. Sin embargo, el bloqueo de la vía de las ERKs no tuvo ningún efecto protector sobre el daño causado por la acrilamida. De este modo, se demostró que la acrilamida produjo en las células Caco-2 una disminución del GSH, un aumento de los ROS y una activación persistente de las JNKs, para finalmente activar la caspasa-3 e inducir la muerte por apoptosis. Por tanto, como consecuencia de la disminución del GSH, la acrilamida desencadenó toda una secuencia de acontecimientos estableciendo una situación de estrés oxidativo en las células intestinales que finalmente producía la muerte por apoptosis.

La disminución del GSH en la mucosa intestinal y el aumento de la expresión y de la activación de las JNKs se ha relacionado con procesos de inflamación intestinal^{72,179}. Además, se ha descrito que durante los procesos inflamatorios se produce un aumento de la apoptosis ligada a una acelerada tasa de recambio celular, que aumenta el riesgo de permeabilidad intestinal¹⁰². De acuerdo con esto, los resultados obtenidos sugieren que la acrilamida podría comprometer la integridad de la barrera intestinal a través del aumento excesivo en la tasa de apoptosis de las células intestinales. Así, de forma general, la ingestión de acrilamida en la dieta de forma continuada puede constituir un factor de riesgo en la dieta ocasionando daños tanto oxidativos como inflamatorios en la mucosa intestinal.

2.2 Los polifenoles del cacao previenen el estrés oxidativo y la apoptosis inducidos por la acrilamida en las células intestinales Caco-2

En los estudios realizados previamente se comprobó que los flavonoides mayoritarios del cacao protegían frente a un modelo de estrés oxidativo inducido por el *t*-BOOH en las células intestinales Caco-2¹⁸⁰. Dado que la acrilamida disminuía el índice GSH/GSSG causando también una situación de estrés oxidativo, se estudió el posible efecto protector de los polifenoles del cacao frente a este tóxico alimentario. En todos los estudios realizados, se comprobó que el pre-tratamiento con el extracto polifenólico de cacao (CPE) y con la PB2 evitaban completamente los efectos citotóxicos producidos por la acrilamida, mientras que el efecto protector de la EC era menor.

La PB2 y el CPE bloquearon la disminución del GSH producida por acción de la acrilamida así como el aumento paralelo en la generación de los ROS. Apoyando estos resultados, Corcuera y colaboradores, 2012¹⁸¹ han demostrado que un extracto polifenólico de cacao protege frente al estrés oxidativo producido por micotoxinas presentes en los alimentos, disminuyendo la generación de ROS en las células HepG2. En nuestros resultados, la prevención del estrés oxidativo por parte del CPE y de la PB2 evitó además la activación de las vías de señales de muerte celular por apoptosis como las JNKs y la caspasa-3 efectora. En este mismo sentido, otros estudios han encontrado resultados similares en células neuronales de ratas frente al estrés oxidativo producido por el HNE¹⁴⁶. Igualmente, tanto el CPE como la PB2 activaron la vía de las ERKs; estas señales probablemente se relacionan con un efecto protector indirecto a través de la regulación de las funciones de proliferación y supervivencia celular. De acuerdo con esto, Martín y colaboradores, 2010¹³² han demostrado previamente que el CPE modula la actividad de las defensas antioxidantes a través de la activación de las vías de las ERKs en las células HepG2. Por tanto, los resultados hallados sugieren que mientras la EC sólo actúa como un potente antioxidante, neutralizando los radicales libres, la PB2 y el CPE podrían también actuar aumentando las defensas endógenas antioxidantes/detoxificantes. Esta hipótesis explicaría el mayor efecto citoprotector de los dos últimos compuestos fenólicos frente a la acrilamida.

Para confirmar esta hipótesis, se evaluó el efecto de los polifenoles del cacao sobre los niveles de proteínas de dos importantes enzimas de detoxificación de xenobióticos: la γ -GCS y la GST. Asimismo, se realizó un estudio en el tiempo del efecto de la acrilamida tanto directamente como tras el pre-tratamiento con los

polifenoles, sobre los niveles de expresión proteicos de estas enzimas de defensa. Cuando las células Caco-2 fueron tratadas directamente con acrilamida, se observó que los niveles de proteína de las enzimas γ -GCS y GST disminuían a lo largo del tiempo. Ciertos estudios han puesto de manifiesto que la disminución de las defensas antioxidantes/detoxificantes en el epitelio intestinal de animales de experimentación está implicada en el desarrollo de procesos inflamatorios como la colitis⁶⁴. Por tanto, los resultados obtenidos con el tratamiento directo de la acrilamida refuerzan la hipótesis de que el consumo excesivo de alimentos con acrilamida puede contribuir al desarrollo de ciertas patologías intestinales. Sin embargo, cuando las células Caco-2 fueron previamente tratadas con los polifenoles del cacao, se observó un aumento basal en los niveles de proteínas de ambas enzimas detoxificantes en el caso de la PB2 y del CPE, pero en ningún caso con la EC. Es de destacar, que dicho aumento basal en los niveles de proteínas se mantenía durante el tratamiento con la acrilamida, impidiendo la disminución producida por el efecto directo de este tóxico. En relación con estos resultados existen estudios con otros compuestos fenólicos que muestran mecanismos de acción similares frente a situaciones de estrés oxidativo. Por ejemplo, se ha descrito que la curcumina, ampliamente utilizada en estudios de quimiopreención, aumenta los niveles basales de la actividad de la enzima antioxidante superóxido dismutasa y evita su disminución durante la situación de estrés oxidativo producida por el H₂O₂ en las células Caco-2¹¹⁰. Igualmente, el refuerzo obtenido en las defensas detoxificantes concuerda con los estudios realizados por Romero y colaboradores, 2006¹⁸². En estos estudios se ha demostrado que el aumento de la expresión de la enzima GST se relaciona con una disminución de la actividad de las JNKs MAPKs y de la muerte celular producida por el estrés oxidativo. Por lo tanto, los estudios de pre-tratamiento demostraron que mediante el refuerzo de los niveles de expresión de las enzimas relacionadas con la síntesis del GSH y de la detoxificación de xenobióticos, el CPE y la PB2 evitaban la disminución del GSH y en consecuencia el estrés oxidativo y la apoptosis producidos por la acrilamida.

Es interesante poner de manifiesto que la dosis de acrilamida utilizada en este estudio fue mucho mayor que la que puede ser encontrada de forma fisiológica en el tracto intestinal. Sin embargo, algunos autores han demostrado que una ingesta prolongada de una dosis más pequeña de alimentos ricos en acrilamida puede también producir efectos tóxicos en el organismo¹⁷⁰. Igualmente, se ha publicado recientemente que una dieta muy cercana a la ingesta diaria de acrilamida en humanos (0,5 mg/kg de

peso corporal/día)¹⁸³ produce un efecto nocivo en ratones, tras 90 días de alimentación, sobre la estructura histológica, la regeneración y la innervación de las paredes del intestino así como sobre la función de la absorción intestinal. En concreto, en relación con los resultados obtenidos en las células Caco-2, la acrilamida produjo un aumento de la apoptosis en las células intestinales de los ratones de experimentación¹⁸³. Por todas estas evidencias, estos resultados deberían de ser tenidos en cuenta, intentando reducir el consumo de alimentos con altas cantidades de acrilamida que se ingieren con la dieta. Del mismo modo, como método de prevención frente al desarrollo de futuras enfermedades, se debería mantener un consumo regular de alimentos ricos en compuestos bioactivos con efecto protector frente a los posibles daños que se producen en la mucosa intestinal.

En resumen, la acrilamida produjo una potente disminución del GSH celular, creando una situación de estrés oxidativo que activaba las vías de señales de las JNKs, implicadas en la posterior activación de la caspasa-3 para desencadenar finalmente la muerte celular por apoptosis. El pretratamiento con el CPE y la PB2 reforzó las enzimas γ -GCS y GST, evitando así la situación de estrés oxidativo producida por la acrilamida y la activación del proceso de muerte celular por apoptosis.

2.3 Mecanismos moleculares inducidos por la procianidina B2 implicados en el refuerzo de los niveles de expresión de la isoforma P1 de la enzima antioxidante/detoxificante GST

Existen numerosos estudios que indican el efecto beneficioso de los flavonoides en la salud¹⁸⁴. De este modo, se ha demostrado que los polifenoles del cacao protegen frente al estrés oxidativo en células intestinales¹⁸⁵. No obstante, a pesar de que se han determinado algunos de los mecanismos de protección celular, todavía no se conocen con exactitud como cada uno de los distintos flavonoides lleva a cabo la activación y la mejora de estos mecanismos de protección. Se ha comprobado que la PB2 puede reforzar algunas de las defensas endógenas detoxificantes y modular vías de señalización celular, como las MAPKs¹⁸⁵. Sin embargo, no se ha demostrado que exista una relación entre la modulación de las MAPKs y el aumento de expresión de enzimas citoprotectoras en las células intestinales Caco-2.

Las enzimas citoprotectoras poseen un gran potencial para disminuir la toxicidad de los xenobióticos ambientales. En particular, se ha visto que los ratones que son deficientes en la isoforma P1 de la enzima GST son más susceptibles de desarrollar

cáncer a través de un aumento de la formación y multiplicidad de adenomas en el colon¹⁸⁶. Numerosos agentes quimiopreventivos, incluyendo a este respecto los compuestos bioactivos de la dieta, actúan modulando las diversas isoformas de la enzima GST¹⁸⁷. De acuerdo con esto, se observó que el pre-tratamiento a largo plazo de las células Caco-2 con la PB2 aumentaba la actividad de la enzima GSTP1 evitando así las situaciones de estrés oxidativo que puedan sobrevenir a las células intestinales. Además, dicho aumento en la actividad de la enzima GSTP1 se relacionó en el tiempo con un aumento en paralelo en los niveles de expresión del ARN mensajero (ARNm) y de la proteína. Por tanto, estos resultados sugieren que la PB2 al igual que otros compuestos fenólicos de la dieta puede modular la expresión génica de dicha enzima detoxificante^{56,188}, fortificando así las defensas endógenas celulares frente a posibles daños producidos por tóxicos consumidos en los alimentos.

El Nrf2, es uno de los principales factores de transcripción implicados en el mantenimiento de la homeostasis celular protegiendo a la célula frente al estrés oxidativo y la inflamación^{68,90}. Este factor de transcripción está involucrado en la regulación de enzimas antioxidantes y detoxificantes, entre ellas la GST, a través de su unión a las secuencias ARE (revisado en Li & Kong, 2009¹⁸⁹). Se ha demostrado que ratones *Knockout* para el factor de transcripción Nrf2 presentan una expresión significativamente menor de enzimas detoxificantes como la GST que los ratones controles y en consecuencia son más susceptibles de desarrollar procesos inflamatorios y cáncer⁹¹.

El Nrf2 puede ser modulado por compuestos fenólicos de la dieta y de esta manera puede prevenir diversas patologías intestinales^{153,190}. En este sentido, debido a la importancia de estas funciones protectoras, el Nrf2 se ha convertido en el centro de atención de numerosas investigaciones en el campo de la prevención nutricional^{64,191}. En nuestros resultados se observó que la PB2 inducía la translocación del Nrf2 al núcleo de forma previa a que se produjese el incremento de la transcripción de los genes de la enzima GSTP1. Los resultados encontrados son similares a los efectos producidos por otros fenoles de la dieta y ciertas plantas medicinales que modulan la expresión génica de las defensas antioxidantes a través de la translocación nuclear del Nrf2¹⁹¹⁻¹⁹². Estos estudios junto con los indicios encontrados en este trabajo, sugieren que la translocación del Nrf2 al núcleo interviene en el aumento de expresión de la enzima GSTP1.

El Nrf2 normalmente se encuentra reprimido en el citosol, unido a Keap1. Sin embargo, puede ser activado por al menos dos mecanismos distintos: 1) por la

estabilización del Nrf2, debida a la modificación de residuos de cisteína en el represor Keap1, que permiten la disociación del factor de transcripción y la posterior translocación nuclear y 2) por la fosforilación directa de quinasas en la propia molécula de Nrf2⁹⁰. Mientras que el mecanismo de estabilización parece estar más relacionado con una respuesta adaptativa a situaciones de estrés oxidativo, la fosforilación en residuos de serina y/o tirosina constituye un mecanismo alternativo de inducción de genes con función citoprotectora que parece estar modulado por compuestos con efectos quimiopreventivos de la dieta⁹⁰.

Las vías de señales de las MAPKs y la PI3K/AKT son algunas de las familias quinasas relacionadas con la fosforilación del Nrf2^{90,193}. Apoyando esta idea, se evaluó el efecto del pretratamiento con la PB2 en las células Caco-2 sobre la fosforilación de las MAPKs (ERKs, JNKs y p38) y la AKT. Los resultados mostraron que la PB2 inducía la fosforilación de las ERKs y p38 mientras que no producía ningún efecto sobre las JNKs y la AKT. Para comprobar si realmente la fosforilación de las ERKs y de la p38 estaba relacionada con la translocación nuclear del Nrf2 y con el refuerzo de la actividad de la enzima GSTP1, se realizaron ensayos de pretratamiento con los inhibidores específicos de ambas MAPKs. Se observó que los inhibidores selectivos de las ERKs y la p38 bloqueaban completamente la translocación del Nrf2 así como el aumento en los niveles de expresión y de la actividad de la enzima GSTP1 inducida por el tratamiento con PB2. Estos resultados demostraron que los efectos citoprotectores producidos por el flavanol del cacao fueron mediados a través de la activación de ambas vías. En este mismo sentido, Shan y colaboradores, 2010¹⁹⁴ han mostrado que el sulfurofano, un conocido activador del Nrf2, también ejerce sus funciones quimiopreventivas a través de la activación de la p38 MAPK en cultivos celulares de cáncer de vejiga.

Finalmente, se realizó un estudio de pre-tratamiento con los inhibidores (de ERKs y de p38) y con la PB2 en las células Caco-2, en el que posteriormente dichas células fueron sometidas a estrés oxidativo. Los resultados obtenidos indicaron que cuando las células eran previamente incubadas con ambos inhibidores la protección celular mediada por la PB2 disminuía significativamente, confirmando que el mecanismo molecular de activación de las vías de señales celulares es uno de los principales modos de acción en la protección ejercida con la PB2 frente al estrés oxidativo.

Estudios recientes, han demostrado que los flavonoides pueden unirse directamente a los sitios de unión del ATP, a bucles de activación y a regiones relacionadas con cambios alostéricos de proteínas quinasas regulando así múltiples vías de señalización celular¹⁹⁵. De este modo, uno de los posibles mecanismos de acción de la PB2 podría ser su unión directa con proteínas quinasas, alterando así, el estado de activación de las quinasas. De acuerdo con esta hipótesis, se ha descrito que la PB2 puede interaccionar directamente con MEK1, la proteína activadora de las vías de las ERKs en una línea celular epidérmica de ratón¹⁴². Además, Fraga & Oteiza, 2011⁹³ han mostrado que la PB2 puede inhibir al factor de transcripción NF-κB por interacción directa con la subunidad p50 de dicho factor de transcripción. Otros estudios han propuesto que las procianidinas interactúan con regiones de la membrana plasmática, sugiriendo que pueden ejercer funciones celulares sin necesidad de penetrar en el interior celular¹⁴⁸⁻¹⁴⁹. Sin embargo, en este sentido aún son necesarias muchas más investigaciones que confirmen y precisen los mecanismos de activación de las vías de señales por los compuestos naturales.

Por tanto, las evidencias mencionadas previamente, junto con los resultados expuestos, apoyan la idea de que los efectos protectores inducidos por la PB2 frente al estrés oxidativo no sólo se deben a sus propiedades antioxidantes sino a la capacidad de la PB2 de modular proteínas específicas en las vías de señalización celular.

En resumen, este estudio demuestra que la PB2 modula la expresión de la GSTP1 a través de la activación por fosforilación de las vías de las ERKs y p38 MAPK, las cuales desempeñan una función esencial activando la translocación del Nrf2. En definitiva, estos resultados muestran algunas de las bases moleculares que permiten a la PB2 prevenir el estrés oxidativo relacionado con daños y patologías intestinales.

3. Efecto protector de una dieta enriquecida en cacao frente al inicio del cáncer de colon en un modelo animal *in vivo*

Diversos estudios en animales de experimentación y en humanos han mostrado que el consumo de cacao puede ejercer propiedades beneficiosas frente a enfermedades cardiovasculares², la diabetes¹⁹⁶ y en diversas enfermedades relacionadas con el proceso inflamatorio¹³⁷.

En los estudios previos realizados en cultivos celulares se han obtenido evidencias de los efectos protectores de los polifenoles del cacao en las células intestinales frente al estrés oxidativo ocasionado por un tóxico de la dieta^{185,197}. Sin

embargo, todavía se conoce poco acerca de los posibles efectos protectores de los polifenoles del cacao sobre el epitelio de la mucosa intestinal del colon en modelos *in vivo*.

En estudios anteriores realizados en el grupo de investigación, se ha observado que una dieta enriquecida en un 16 % con cacao reduce el riesgo cardiovascular y protege frente al daño hepático producido por el estrés oxidativo^{138,198}. Similarmente, Ramiro-Puig y colaboradores¹⁹⁹ han mostrado que una dieta enriquecida con el 10% de cacao modula la respuesta inmune intestinal de ratas de experimentación. En este trabajo, considerando estos estudios previos, se evaluó el potencial efecto quimiopreventivo de una dieta enriquecida con un 12 % de cacao en las lesiones pre-neoplásicas inducidas por el AOM en ratas de experimentación.

La dieta enriquecida al 12 % con cacao proporcionó 0,9 gramos de flavanoles por kilogramo de dieta. De esta forma, la dosis media de flavanoles que recibieron con la dieta fue de aproximadamente 15 mg/día. Durante el periodo de estudio, no se encontraron diferencias de ingesta entre las ratas alimentadas con la dieta control y la dieta enriquecida con un 12 % de cacao. En el examen anatómico visceral, tampoco se observaron diferencias morfológicas entre los animales tratados con AOM o con suero salino y los alimentados con la dieta control o con la de cacao. Igualmente, no se detectaron diferencias de peso o de tamaño en el colon de los animales. Sin embargo, es de destacar que el peso corporal de las ratas alimentadas con la dieta de cacao fue significativamente menor que el de las alimentadas con la dieta control. Estos hallazgos son similares a los de otros estudios en los que se ha mostrado que una dieta enriquecida en cacao producía una disminución del peso corporal de los animales, a través de la reducción del tejido blanco adiposo mesentérico y en los que no se produjeron cambios en la morfología de la estructura intestinal¹⁹⁹⁻²⁰⁰. A este respecto, Matsui y colaboradores, 2005²⁰⁰ han propuesto que el cacao podría disminuir el tejido adiposo modulando el metabolismo lipídico, mostrando así un importante efecto frente a la obesidad.

El modelo de cáncer de colon inducido por AOM ha sido extensamente usado para examinar los efectos quimiopreventivos de numerosos compuestos frente al cáncer colorrectal¹²². El AOM es un carcinógeno específico del colon y su administración en roedores produce el desarrollo de los focos de criptas aberrantes¹²². En este sentido, se evaluó el efecto de la dieta de cacao sobre la inhibición de los ACF inducidos por AOM en las ratas de experimentación. Los resultados mostraron que las ratas inyectadas con

AOM desarrollaron criptas aberrantes, mientras que las ratas alimentadas con la dieta enriquecida en cacao disminuyeron significativamente la formación de los ACF inducidos por el AOM. El incremento en el número y en la multiplicidad de los ACF está relacionado con el aumento del riesgo de desarrollar cáncer de colon¹²¹. Así, los ACF con una multiplicidad de cripta de cuatro o mayor de cuatro son las más propensas a desarrollar el cáncer de colon²⁰¹. De acuerdo con esto, en los animales alimentados con la dieta enriquecida en cacao se observó una marcada reducción de este importante marcador de riesgo del inicio y desarrollo del cáncer.

Los estudios experimentales con roedores han demostrado que el AOM puede inducir estrés oxidativo e inflamación, los cuales producen inestabilidad cromosómica y daños en el ADN dando lugar a la formación de los ACF en el colon^{164,202-203}. Por esta razón, numerosos estudios se han centrado en investigar las propiedades de los compuestos naturales de la dieta implicadas en la prevención de algunas de las patologías que contribuyen en la formación de los ACF. Así, por ejemplo existen estudios que demuestran que la EGCG interfiere con las vías de señales celulares inhibiendo la proliferación²⁰⁴, mientras que la apigenina induce la apoptosis en las células iniciadas²⁰⁵ o el farnesol disminuye el proceso inflamatorio¹²³, contribuyendo en todos los casos a una reducción de las lesiones pre-neoplásicas causadas por el AOM. De esta manera, en el presente trabajo de investigación, se evaluaron algunos de los potenciales efectos quimiopreventivos de la dieta de cacao rica en flavanoles frente a las lesiones pre-neoplásicas inducidas por el AOM.

3.1 Efectos antioxidantes de la dieta enriquecida en cacao

Con el fin de determinar si las propiedades antioxidantes del cacao podían prevenir el daño oxidativo producido por el AOM, se analizaron los biomarcadores de daño oxidativo a proteínas (grupos carbonilos) y a lípidos (MDA) en el colon distal de los animales. En los resultados se observó un aumento significativo en los niveles de daño a proteínas y a lípidos en los animales tratados con AOM respecto al grupo control sin tratar. No obstante, lo más importante fue que el incremento de ambos biomarcadores de daño oxidativo fue prevenido en el grupo tratado con AOM y alimentado con la dieta de cacao. Estos resultados sugieren que las propiedades antioxidantes del cacao podrían proteger frente al daño oxidativo inducido por el AOM en el colon. Esta hipótesis está de acuerdo con los estudios realizados por Khan & Sultana, 2011¹²³ en los que demuestran que el farnesol, un compuesto antioxidante de la

dieta, disminuye la producción de especies reactivas del oxígeno y en consecuencia inhibe la fase inicial del cáncer colorrectal en animales de experimentación.

Tanto el glutatión como las enzimas dependientes de él constituyen uno de los principales mecanismos de defensa para controlar el equilibrio redox en la mucosa intestinal⁵⁷. En los estudios realizados se comprobó que tanto los niveles de GSH como la actividad de las enzimas antioxidantes/detoxificantes GPx, GR y GST se vieron disminuidos en el colon de los animales tratados con AOM respecto a los controles. No obstante, la dieta de cacao además de prevenir el daño oxidativo mantuvo intactos los niveles basales de defensas enzimáticas y no enzimáticas de la mucosa colónica de las ratas tratadas con AOM. Los resultados obtenidos están de acuerdo con otros estudios que indican que un incremento de la actividad de las defensas enzimáticas antioxidantes tiene efectos quimiopreventivos frente al cáncer de colon^{202,206}. Por tanto, como consecuencia de la reducción de los daños oxidativos a las macromoléculas celulares y del refuerzo en los niveles y en la actividad de los mecanismos de defensa antioxidantes/detoxificantes, el cacao podrían prevenir la formación de los ACF inducidas por AOM

3.2 Efectos anti-proliferativos de la dieta enriquecida en cacao

Los ROS no sólo producen daños oxidativos sobre las macromoléculas celulares (ADN, lípidos y proteínas). Igualmente, pueden modular las vías de señales sensibles a cambios redox, contribuyendo en el desarrollo de las fases de iniciación y promoción del cáncer colorrectal a través de una activación persistente de la proliferación y la supervivencia celular^{38,82-83}. En este sentido, se ha descrito que la PI3K/AKT y las ERKs MAPK son las vías de supervivencia más importantes activadas en respuesta al estrés oxidativo implicadas en el desarrollo de la carcinogénesis⁸². En este trabajo, se encontró una activación significativamente importante en las vías PI3K/AKT y ERKs en los animales que fueron tratados con AOM. Asimismo, se detectó un incremento en la expresión de la ciclina D1, un importante marcador de proliferación celular²⁰⁷. Estos hallazgos fueron confirmados por los resultados obtenidos del ensayo histológico de cuantificación de la proliferación celular (PCNA, del inglés, *proliferating cell nuclear antigen*) que indicaron un aumento de la tasa de proliferación de las células colónicas de los animales tratados con AOM. Sin embargo, cuando las ratas tratadas con AOM fueron alimentadas con la dieta de cacao, ninguno de los marcadores de proliferación se encontró aumentado. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por otros

autores (revisado en Nandakumar y colaboradores, 2008¹⁵²) que han mostrado que las proantocianidinas de la uva también pueden modular las vías de señales sensibles a cambios redox para ejercer efectos anti-proliferativos y pro-apoptóticos en diversas líneas celulares y en animales de experimentación. En concreto, se ha demostrado recientemente que la luteolina y la quercetina llevan a cabo dichos efectos a través de la regulación de las vías ERKs y PI3K/AKT en células humanas de cáncer colorrectal²⁰⁸.

En definitiva, estos resultados sugieren que la dieta utilizada enriquecida en cacao presenta efectos anti-proliferativos que actúan inhibiendo la activación de las vías de señales implicadas en proliferación y disminuyendo de esta manera las lesiones preneoplásicas producidas por el AOM.

3.3 Efectos anti-inflamatorios de la dieta enriquecida en cacao

Existen estudios que evidencian que una disminución de las defensas antioxidantes^{64, 123} y alteraciones en las vías de señales celulares^{72, 112} contribuyen en el origen de numerosas enfermedades inflamatorias intestinales. De esta manera, como consecuencia del tratamiento con el AOM se observó que las ratas desarrollaron un proceso inflamatorio en el tejido del colon. Dicho proceso inflamatorio se caracterizó por una destrucción de la arquitectura epitelial, con criptas de morfología irregular e infiltración de células inflamatorias en la lámina propia. Sin embargo, en las ratas alimentadas con cacao se redujo significativamente el proceso inflamatorio ocasionado en la mucosa del colon por el AOM. En este mismo sentido, se ha demostrado que la administración de solo dos dosis de un extracto de polifenoles de cacao reduce el daño colónico y la infiltración de neutrófilos en un modelo agudo de colitis ulcerosa inducido por sulfato de dextrano sódico⁴¹.

Dada la actividad anti-inflamatoria de la dieta enriquecida en cacao sobre la mucosa colónica, se estudió su efecto en la expresión de dos enzimas inflamatorias ampliamente implicadas en los estadios iniciales de la formación tumoral, como son la COX-2 y la iNOS²⁰⁹. Asimismo, un aumento en la expresión de estas enzimas es frecuentemente observado durante la carcinogénesis inducida por el AOM en las ratas de experimentación²⁰⁹. En los resultados obtenidos, se encontró que la dieta enriquecida en cacao inhibía significativamente la expresión de estas enzimas en las ratas tratadas con AOM. De este modo, la prevención del aumento de expresión de la iNOS y de la COX-2 parece ser otro de los factores relacionados con la inhibición de la formación de los ACF en las ratas tratadas con AOM y alimentadas con la dieta enriquecida en cacao.

Una de las actividades anti-inflamatorias más importantes de algunos compuestos fenólicos es su capacidad para modular la activación del factor de transcripción NF- κ B¹²⁰. El NF- κ B está considerado uno de los principales factores de transcripción que relaciona la inflamación con la carcinogénesis¹¹⁵⁻¹¹⁶. Así, una activación del NF- κ B promueve una expresión excesiva de genes inflamatorios, entre ellos los genes de las ya mencionadas enzimas iNOS y COX-2¹¹⁵. Además, de forma general, una activación persistente del NF- κ B está relacionada con un aumento de la función proliferativa y anti-apoptótica, lo que favorece la supervivencia de células tumorales e inicia el desarrollo del cáncer¹¹⁵⁻¹¹⁶. De acuerdo con esto, los estudios histológicos realizados en el colon mostraron un claro aumento de los niveles del NF- κ B en los núcleos de las células colónicas de los animales que fueron tratados con AOM. No obstante, dicho aumento del factor de transcripción estuvo significativamente disminuido en los animales alimentados con la dieta de cacao. Por consiguiente, este hecho sugiere que los efectos de inhibición en la expresión de las enzimas COX-2 e iNOS en los animales alimentados con la dieta de cacao parecen estar mediados por la disminución previa de la activación del NF- κ B. Estos resultados coinciden con otros estudios en los que se muestran que ciertos compuestos naturales suprimen los niveles de expresión de ambas enzimas a través de la modulación del NF- κ B²¹⁰⁻²¹¹. Por tanto, la supresión en la translocación del NF- κ B por la dieta de cacao parece contribuir no solo a la disminución del proceso inflamatorio, sino también a la reducción del desarrollo y de la formación de los ACF inducidos por AOM en la mucosa colónica.

En los estudios previos realizados en cultivos celulares se ha puesto de manifiesto que los compuestos polifenólicos del cacao pueden regular vías de señales celulares^{132,185} y también ciertos factores de transcripción^{145,197}. A través de la regulación de estos mecanismos moleculares, los compuestos polifenólicos del cacao han demostrado modular la expresión y la función de genes específicos¹⁹⁷. El NF- κ B, al igual que otros factores de transcripción, es activado en respuesta al estrés oxidativo y a los estímulos pro-inflamatorios, al menos en parte, por una serie de vías de señales celulares entre las que se incluyen las MAPKs, como las ERKs, las JNKs y la p38. Para precisar los mecanismos moleculares de protección de los polifenoles de la dieta de cacao frente al proceso inflamatorio, se evaluó el efecto de dichos polifenoles sobre las vías de señales implicadas en la inflamación en la línea celular Caco-2. Así, se realizaron estudios *in vitro* de co-tratamiento entre el extracto de polifenoles obtenido a partir del cacao utilizado en la dieta de los animales (CPE) y un potente inductor de la

inflamación, como es el TNF- α . Los resultados obtenidos indicaron que el tratamiento de las células con el CPE producía una significativa reducción de la secreción de IL-8 y de la expresión de la COX-2 y la iNOS, inducidos por el agente pro-inflamatorio TNF- α . Además, previamente al descenso de estos marcadores inflamatorios, se observó que el CPE produjo una disminución significativa en la activación de las JNKs y de la translocación nuclear del NF- κ B, ambos inducidos por el TNF- α . Estas evidencias sugieren que la inhibición de la vía de las JNKs y del factor de transcripción NF- κ B podría ser un importante mecanismo a través del cual la dieta de cacao contribuye a disminuir la inflamación intestinal. De acuerdo con esta hipótesis, se ha demostrado que la inhibición de las JNKs podría prevenir el proceso inflamatorio así como la enfermedad inflamatoria intestinal²¹². Asimismo, Pan y colaboradores, 2011¹²⁰ han mostrado que otros compuestos naturales de la dieta también reducen la inflamación a través del bloqueo selectivo de las MAPKs y el NF- κ B.

3.4 Efectos apoptóticos de la dieta enriquecida en cacao

La apoptosis aporta un mecanismo adicional de protección contra la neoplasia⁸⁶. Está ampliamente descrito que algunos flavonoides pueden ejercer efectos antitumorales induciendo apoptosis en las células cancerígenas^{86,120}. Así, se estudió el posible efecto pro-apoptótico de la dieta de cacao sobre las lesiones pre-neoplásicas inducidas por el AOM. En la evaluación histológica de la mucosa colónica realizada por TUNEL (del inglés *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) se encontró que la dieta de cacao ejercía un claro efecto pro-apoptótico en el tejido colónico de las ratas tratadas con AOM. Además, el incremento de la apoptosis fue observado en la superficie luminal, indicando que la alimentación con cacao contribuía a restituir la homeostasis en la mucosa colónica a través de la eliminación de las células dañadas por el AOM. Para precisar los mecanismos moleculares del efecto pro-apoptótico de la dieta de cacao, se estudiaron los niveles proteicos de algunas de las proteínas pro-apoptóticas (Bax) y antiapoptóticas (Bcl-x_L) y la actividad de la caspasa-3, todas ellas implicadas en la señalización molecular del proceso de apoptosis. Nuestros resultados mostraron que las ratas tratadas con AOM presentaban una clara disminución de la expresión de los niveles de Bax en relación con un aumento en los niveles de Bcl-x_L, mientras que la actividad caspasa-3 permaneció inalterada. De esta forma, el AOM producía un claro efecto anti-apoptotico, contribuyendo a la formación de los ACF y al establecimiento de las fases iniciales del cáncer de colon. Sin embargo, en el grupo de ratas alimentadas

con la dieta de cacao y tratadas con AOM se encontró un incremento significativo en los niveles de Bax y de la actividad de la caspasa-3, así como una marcada disminución en la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-x_L. En definitiva, estos datos indican que la dieta de cacao induce la activación de señales moleculares implicadas en la apoptosis celular de la mucosa colónica impidiendo la formación de los ACF inducidos por el AOM en los animales de experimentación. Estos resultados están de acuerdo con la revisión realizada por Pan y colaboradores, 2011¹²⁰ en la que se describe el efecto apoptótico de los compuestos naturales de la dieta como uno de los principales mecanismos de prevención del cáncer colorrectal.

En resumen, la dieta enriquecida en cacao presentó un claro efecto quimiopreventivo frente al daño pre-neoplásico inducido por el carcinógeno AOM en el colon distal de las ratas de experimentación. De esta forma, la dieta de cacao evitó la fase más temprana del cáncer de colon por distintos mecanismos: a) reforzando las defensas antioxidantes y limitando el daño oxidativo a macromoléculas, b) bloqueando la activación de las vías de señales que intervienen en el proceso proliferativo, como son la PI3K/AKT, las ERKs/MAPK y la proteína reguladora del ciclo celular, la ciclina D1, c) reduciendo la inflamación, a través del bloqueo de las vías de señales JNKs/MAPK y del factor de transcripción NF-κB y d) aumentando la tasa de apoptosis, a través de la modulación de las señales pro- (Bax) y anti-apoptóticas (Bcl-x_L) y de la actividad caspasa-3. Por tanto, estas evidencias sugieren que el consumo moderado de cacao puede ser una importante fuente de polifenoles que pueden contribuir a mejorar la salud intestinal y a prevenir algunas de las patologías asociadas con el inicio del cáncer.

Conclusiones

Los resultados obtenidos de este trabajo, han permitido extraer las siguientes conclusiones:

1. El pre-tratamiento de las células intestinales Caco-2 con dosis fisiológicas (10 μ M) de los flavanoles epicatequina, epicatequina galato, epigallocatequina-3-galato y procianidina B2 ejerce un efecto protector frente al daño oxidativo y la muerte celular inducido por un potente pro-oxidante como el *tert*-butilhidroperóxido. Este efecto se relaciona con una disminución de las especies reactivas del oxígeno y con un bloqueo de la actividad de la caspasa-3. De los distintos flavanoles estudiados, la procianidina B2 presenta la mayor efectividad protegiendo a las células Caco-2 al menos por dos mecanismos distintos: a través de su capacidad antioxidante, neutralizando directamente los radicales libres y aumentando la actividad de las defensas endógenas antioxidantes.
2. El tratamiento de las células Caco-2 con un tóxico alimentario como la acrilamida induce una importante disminución del glutathion intracelular, dando paso a un cuadro de estrés oxidativo. Dicho cuadro se caracteriza por la activación de las vías de señales de las JNKs y el posterior aumento de la actividad caspasa-3 que finalmente induce la muerte celular por apoptosis.
3. El pre-tratamiento de las células Caco-2 con dosis fisiológicas de un extracto polifenólico de cacao (10 μ g/ml) y de procianidina B2 (10 μ M) previene la disminución de glutathion intracelular y la posterior situación de estrés oxidativo y muerte celular inducida por la acrilamida. Este efecto protector parece estar relacionado con el refuerzo de los niveles de las enzimas detoxificantes γ -glutamylcisteína sintetasa y glutathion S transferasa.
4. La procianidina B2 modula las vías de señalización celular para reforzar la expresión de la isoforma P1 de la enzima detoxificante glutathion S transferasa. En concreto, activa las vías ERKs y p38 MAPK que posteriormente desencadenan la translocación del factor de transcripción Nrf2 al núcleo celular para aumentar la expresión de dicha enzima detoxificante.

5. Los animales de experimentación alimentados durante 8 semanas con una dieta enriquecida al 12 % con cacao presentan una disminución de las lesiones pre-neoplásicas en el colon inducidas por el tóxico azoximetano.
6. La dieta enriquecida en cacao es capaz de prevenir la fase temprana del cáncer de colon por distintos mecanismos que incluyen: 1) la disminución del daño oxidativo y la inhibición del proceso proliferativo, modulando las vías de señales PI3K/AKT, ERKs y la ciclina D1, 2) la reducción de la inflamación a través del bloqueo del factor de transcripción NF- κ B y 3) la inducción de la apoptosis en las células dañadas de la mucosa intestinal, a través de la regulación de las señales pro-apoptóticas (Bax), anti-apoptóticas (Bcl-x_L) y de la caspasa-3 efectora del proceso.

En resumen, los resultados obtenidos en cultivos celulares y en animales de experimentación han puesto de manifiesto que el consumo moderado de cacao, como una fuente importante de polifenoles al igual que las frutas y las verduras, puede contribuir a mejorar la salud intestinal y a prevenir algunas de las patologías asociadas con el estrés oxidativo y la inflamación.

Bibliografía

1. D'Archivio M, Filesi C, Di Benedetto R, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanita*. 2007;43(4):348-61.
2. Heiss C, Schroeter H, Balzer J, Kleinbongard P, Matern S, Sies H, et al. Endothelial function, nitric oxide, and cocoa flavanols. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2006;47 Suppl 2:S128-35; discussion S72-6.
3. Weng CJ, Yen GC. Chemopreventive effects of dietary phytochemicals against cancer invasion and metastasis: phenolic acids, monophenol, polyphenol, and their derivatives. *Cancer Treat Rev*. 2012 Feb;38(1):76-87.
4. Vauzour D, Rodriguez-Mateos A, Corona G, Oruna-Concha MJ, Spencer JP. Polyphenols and human health: prevention of disease and mechanisms of action. *Nutrients*. 2010 Nov;2(11):1106-31.
5. Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2009 Nov-Dec;2(5):270-8.
6. Leuzzi U, Caristi C, Panzera V, Licandro G. Flavonoids in pigmented orange juice and second-pressure extracts. *J Agric Food Chem*. 2000 Nov;48(11):5501-6.
7. Mazza G, Cacace JE, Kay CD. Methods of analysis for anthocyanins in plants and biological fluids. *J AOAC Int*. 2004 Jan-Feb;87(1):129-45.
8. Anderson OMJ, M. The anthocyanins. In: Anderon OMM, K.R., editor. *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*: CRC Press/Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL, USA; 2006. p. 472-551.
9. Cortell JM, Kennedy JA. Effect of shading on accumulation of flavonoid compounds in (*Vitis vinifera* L.) pinot noir fruit and extraction in a model system. *J Agric Food Chem*. 2006 Nov 1;54(22):8510-20.
10. Lee KW, Kim YJ, Lee HJ, Lee CY. Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *J Agric Food Chem*. 2003 Dec 3;51(25):7292-5.
11. de Pascual-Teresa S, Santos-Buelga C, Rivas-Gonzalo JC. Quantitative analysis of flavan-3-ols in Spanish foodstuffs and beverages. *J Agric Food Chem*. 2000 Nov;48(11):5331-7.
12. Rasmussen SE, Frederiksen H, Struntze Krogholm K, Poulsen L. Dietary proanthocyanidins: occurrence, dietary intake, bioavailability, and protection against cardiovascular disease. *Mol Nutr Food Res*. 2005 Feb;49(2):159-74.
13. Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. 2010;15(10):7313-52.
14. Crozier TW, Stalmach A, Lean ME, Crozier A. Espresso coffees, caffeine and chlorogenic acid intake: potential health implications. *Food Funct*. 2012 Jan;3(1):30-3.
15. Schroder H, de la Torre R, Estruch R, Corella D, Martinez-Gonzalez MA, Salas-Salvado J, et al. Alcohol consumption is associated with high concentrations of urinary hydroxytyrosol. *Am J Clin Nutr*. 2009 Nov;90(5):1329-35.
16. Delmas D, Lancon A, Colin D, Jannin B, Latruffe N. Resveratrol as a chemopreventive agent: a promising molecule for fighting cancer. *Curr Drug Targets*. 2006 Apr;7(4):423-42.
17. King RE, Bomser JA, Min DB. Bioactivity of resveratrol. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2006 2006;5(3):65-70.

18. Visioli F, Alarcon de la Lastra C, Andres-Lacueva C, Aviram M, Calhau C, Cassano A, et al. Polyphenols and human health: a prospectus. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2011;51(6):524-46.
19. Neveu V, Perez-Jimenez J, Vos F, Crespy V, du Chaffaut L, Mennen L, et al. Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. *Database (Oxford)*. 2010;2010:bap024.
20. Miglio C, Chiavaro E, Visconti A, Fogliano V, Pellegrini N. Effects of different cooking methods on nutritional and physicochemical characteristics of selected vegetables. *J Agric Food Chem*. 2008 Jan 9;56(1):139-47.
21. Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*. 2004 May;79(5):727-47.
22. Scalbert A, Johnson IT, Saltmarsh M. Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr*. 2005 Jan;81(1 Suppl):215S-7S.
23. Visioli F, De La Lastra CA, Andres-Lacueva C, Aviram M, Calhau C, Cassano A, et al. Polyphenols and human health: a prospectus. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2011 Jul;51(6):524-46.
24. Rodrigo R, Miranda A, Vergara L. Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. *Clin Chim Acta*. 2011 Feb 20;412(5-6):410-24.
25. Monagas M, Urpi-Sarda M, Sanchez-Patan F, Llorach R, Garrido I, Gomez-Cordoves C, et al. Insights into the metabolism and microbial biotransformation of dietary flavan-3-ols and the bioactivity of their metabolites. *Food & Function*. 2010 2010;1(3):233-53.
26. Vitaglione P, Donnarumma G, Napolitano A, Galvano F, Gallo A, Scalfi L, et al. Protocatechuic acid is the major human metabolite of cyanidin-glucosides. *J Nutr*. 2007 Sep;137(9):2043-8.
27. Hidalgo M, Martin-Santamaria S, Recio I, Sanchez-Moreno C, de Pascual-Teresa B, Rimbach G, et al. Potential anti-inflammatory, anti-adhesive, anti/estrogenic, and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities of anthocyanins and their gut metabolites. *Genes Nutr*. 2012 Jan 5.
28. Williamson G, Barron D, Shimo K, Terao J. In vitro biological properties of flavonoid conjugates found in vivo. *Free Radical Research*. 2005;39(5):457-69.
29. Halliwell B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Arch Biochem Biophys*. 2008 Aug 15;476(2):107-12.
30. Virgili F, Marino M. Regulation of cellular signals from nutritional molecules: a specific role for phytochemicals, beyond antioxidant activity. *Free Radic Biol Med*. 2008 Nov 1;45(9):1205-16.
31. Dong ZSY-JPLC, E. . *Dietary Modulation of Cell Signalling Pathways*. CRC Press, Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL, USA; 2009.
32. Soobrattee MA, Neergheen VS, Luximon-Ramma A, Aruoma OI, Bahorun T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutat Res*. 2005 Nov 11;579(1-2):200-13.
33. Ramos S, Alia M, Bravo L, Goya L. Comparative effects of food-derived polyphenols on the viability and apoptosis of a human hepatoma cell line (HepG2). *J Agric Food Chem*. 2005 Feb 23;53(4):1271-80.
34. Martinez ME. Primary prevention of colorectal cancer: lifestyle, nutrition, exercise. *Recent Results Cancer Res*. 2005;166:177-211.

35. Granado-Serrano AB, Martin MA, Bravo L, Goya L, Ramos S. Quercetin induces apoptosis via caspase activation, regulation of Bcl-2, and inhibition of PI-3-kinase/Akt and ERK pathways in a human hepatoma cell line (HepG2). *J Nutr.* 2006 Nov;136(11):2715-21.
36. Chen WP, Chi TC, Chuang LM, Su MJ. Resveratrol enhances insulin secretion by blocking K(ATP) and K(V) channels of beta cells. *Eur J Pharmacol.* 2007 Jul 30;568(1-3):269-77.
37. Markus MA, Morris BJ. Resveratrol in prevention and treatment of common clinical conditions of aging. *Clin Interv Aging.* 2008;3(2):331-9.
38. Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Nilsa RD, Huang P. Redox regulation of cell survival. *Antioxid Redox Signal.* 2008 Aug;10(8):1343-74.
39. Vauzour D, Vafeiadou K, Rice-Evans C, Williams RJ, Spencer JP. Activation of pro-survival Akt and ERK1/2 signalling pathways underlie the anti-apoptotic effects of flavanones in cortical neurons. *J Neurochem.* 2007 Nov;103(4):1355-67.
40. Kroon PA, Clifford MN, Crozier A, Day AJ, Donovan JL, Manach C, et al. How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro? *Am J Clin Nutr.* 2004 Jul;80(1):15-21.
41. Andujar I, Recio MC, Giner RM, Cienfuegos-Jovellanos E, Laghi S, Muguerza B, et al. Inhibition of ulcerative colitis in mice after oral administration of a polyphenol-enriched cocoa extract is mediated by the inhibition of STAT1 and STAT3 phosphorylation in colon cells. *J Agric Food Chem.* 2011 Jun 22;59(12):6474-83.
42. Friedman J. The role of free radicals in the nervous system. In: Gaduth NG, H.H. Oxidative stress and free radical, editor. *Oxidative stress in applied basic research and clinical practice* Totowa: Humana Press; 2011. p. 1-17.
43. Raza H. Dual localization of glutathione S-transferase in the cytosol and mitochondria: implications in oxidative stress, toxicity and disease. *FEBS J.* 2011 Nov;278(22):4243-51.
44. Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal.* 2012 Jan 20.
45. Ioannidis O, Varnalidis I, Paraskevas G, Botsios D. Nutritional modulation of the inflammatory bowel response. *Digestion.* 2011;84(2):89-101.
46. Maes M, Galecki P, Chang YS, Berk M. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2011 Apr 29;35(3):676-92.
47. Wang Y, Yu C, Pan Y, Yang X, Huang Y, Feng Z, et al. A Novel Synthetic Mono-Carbonyl Analogue of Curcumin, A13, Exhibits Anti-Inflammatory Effects In vivo by Inhibition of Inflammatory Mediators. *Inflammation.* 2012 Apr;35(2):594-604.
48. Dalle-Donne I, Scaloni A, Giustarini D, Cavarra E, Tell G, Lungarella G, et al. Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: the contribution of redox proteomics. *Mass Spectrom Rev.* 2005 Jan-Feb;24(1):55-99.
49. Bartsch H, Nair J. Chronic inflammation and oxidative stress in the genesis and perpetuation of cancer: role of lipid peroxidation, DNA damage, and repair. *Langenbecks Arch Surg.* 2006 Sep;391(5):499-510.
50. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44-84.

51. Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*. 2009 Jul;30(7):1073-81.
52. Grady WM, Carethers JM. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology*. 2008 Oct;135(4):1079-99.
53. Pan MH, Lai CS, Tsai ML, Wu JC, Ho CT. Molecular mechanisms for anti-aging by natural dietary compounds. *Mol Nutr Food Res*. 2012 Jan;56(1):88-115.
54. Franco R, Cidlowski JA. Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant. *Cell Death Differ*. 2009 Oct;16(10):1303-14.
55. Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med*. 2010 Mar 15;48(6):749-62.
56. Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem*. 2005 Oct;16(10):577-86.
57. Circu ML, Aw TY. Redox biology of the intestine. *Free Radic Res*. 2011 Nov;45(11-12):1245-66.
58. Perricone C, De Carolis C, Perricone R. Glutathione: a key player in autoimmunity. *Autoimmun Rev*. 2009 Jul;8(8):697-701.
59. Fujii J, Ito JI, Zhang X, Kurahashi T. Unveiling the roles of the glutathione redox system in vivo by analyzing genetically modified mice. *J Clin Biochem Nutr*. 2011 Sep;49(2):70-8.
60. Brigelius-Flohe R, Kipp A. Glutathione peroxidases in different stages of carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Nov;1790(11):1555-68.
61. Herbette S, Roeckel-Drevet P, Drevet JR. Seleno-independent glutathione peroxidases. More than simple antioxidant scavengers. *FEBS J*. 2007 May;274(9):2163-80.
62. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005;45:51-88.
63. Rezaie A, Parker RD, Abdollahi M. Oxidative stress and pathogenesis of inflammatory bowel disease: an epiphenomenon or the cause? *Dig Dis Sci*. 2007 Sep;52(9):2015-21.
64. Zhu H, Li YR. Oxidative stress and redox signaling mechanisms of inflammatory bowel disease: updated experimental and clinical evidence. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2012 Mar 22.
65. Brigelius-Flohe R, Flohe L. Basic principles and emerging concepts in the redox control of transcription factors. *Antioxid Redox Signal*. 2011 Oct 15;15(8):2335-81.
66. Forman HJ, Maiorino M, Ursini F. Signaling functions of reactive oxygen species. *Biochemistry*. 2010 Feb 9;49(5):835-42.
67. Ma Q. Transcriptional responses to oxidative stress: pathological and toxicological implications. *Pharmacol Ther*. 2010 Mar;125(3):376-93.
68. Acharya A, Das I, Chandhok D, Saha T. Redox regulation in cancer: a double-edged sword with therapeutic potential. *Oxid Med Cell Longev*. 2010 Jan-Feb;3(1):23-34.
69. Raman M, Chen W, Cobb MH. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene*. 2007 May 14;26(22):3100-12.
70. Cuadrado A, Nebreda AR. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J*. 2010 Aug 1;429(3):403-17.

71. Ramos JW. The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40(12):2707-19.
72. Coskun M, Olsen J, Seidelin JB, Nielsen OH. MAP kinases in inflammatory bowel disease. *Clin Chim Acta.* 2011 Mar 18;412(7-8):513-20.
73. Teis D, Taub N, Kurzbauer R, Hilber D, de Araujo ME, Erlacher M, et al. p14-MP1-MEK1 signaling regulates endosomal traffic and cellular proliferation during tissue homeostasis. *J Cell Biol.* 2006 Dec 18;175(6):861-8.
74. Ajenjo N, Canon E, Sanchez-Perez I, Matallanas D, Leon J, Perona R, et al. Subcellular localization determines the protective effects of activated ERK2 against distinct apoptogenic stimuli in myeloid leukemia cells. *J Biol Chem.* 2004 Jul 30;279(31):32813-23.
75. Anjum R, Blenis J. The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 Oct;9(10):747-58.
76. Zeissig S, Bergann T, Fromm A, Bojarski C, Heller F, Guenther U, et al. Altered ENaC expression leads to impaired sodium absorption in the noninflamed intestine in Crohn's disease. *Gastroenterology.* 2008 May;134(5):1436-47.
77. Kim EK, Choi EJ. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta.* 2010 Apr;1802(4):396-405.
78. Kang NJ, Shin SH, Lee HJ, Lee KW. Polyphenols as small molecular inhibitors of signaling cascades in carcinogenesis. *Pharmacol Ther.* 2011 Jun;130(3):310-24.
79. Shaulian E. AP-1--The Jun proteins: Oncogenes or tumor suppressors in disguise? *Cell Signal.* 2010 Jun;22(6):894-9.
80. Broom OJ, Widjaya B, Troelsen J, Olsen J, Nielsen OH. Mitogen activated protein kinases: a role in inflammatory bowel disease? *Clin Exp Immunol.* 2009 Dec;158(3):272-80.
81. Arthur JS. MSK activation and physiological roles. *Front Biosci.* 2008;13:5866-79.
82. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med.* 2010 Dec 1;49(11):1603-16.
83. Engelman JA. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer.* 2009 Aug;9(8):550-62.
84. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell.* 2007 Jun 29;129(7):1261-74.
85. Smith DL, Nolden, L.K., Mills, G.B., Lu, Y. , editor.: Ed Gerwitz, D.A., Holt, S.E., Grant, S., Humana Press, New Jersey. 2007.
86. Ramos S. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *J Nutr Biochem.* 2007 Jul;18(7):427-42.
87. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene.* 2007 Feb 26;26(9):1324-37.
88. Roset R, Ortet L, Gil-Gomez G. Role of Bcl-2 family members on apoptosis: what we have learned from knock-out mice. *Front Biosci.* 2007;12:4722-30.
89. Pan JS, Hong MZ, Ren JL. Reactive oxygen species: a double-edged sword in oncogenesis. *World J Gastroenterol.* 2009 Apr 14;15(14):1702-7.

90. Surh YJ, Kundu JK, Na HK. Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals. *Planta Med.* 2008 Oct;74(13):1526-39.
91. Li W, Khor TO, Xu C, Shen G, Jeong WS, Yu S, et al. Activation of Nrf2-antioxidant signaling attenuates NF-kappaB-inflammatory response and elicits apoptosis. *Biochem Pharmacol.* 2008 Dec 1;76(11):1485-9.
92. Naugler WE, Karin M. NF-kappaB and cancer-identifying targets and mechanisms. *Curr Opin Genet Dev.* 2008 Feb;18(1):19-26.
93. Fraga CG, Oteiza PI. Dietary flavonoids: Role of (-)-epicatechin and related procyanidins in cell signaling. *Free Radic Biol Med.* 2011 Aug 15;51(4):813-23.
94. Jung Y, Kim H, Min SH, Rhee SG, Jeong W. Dynein light chain LC8 negatively regulates NF-kappaB through the redox-dependent interaction with IkappaBalpha. *J Biol Chem.* 2008 Aug 29;283(35):23863-71.
95. Sies H, Stahl W, Sevanian A. Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. *J Nutr.* 2005 May;135(5):969-72.
96. Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med.* 2009 Feb-Apr;30(1-2):42-59.
97. Groschwitz KR, Hogan SP. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol.* 2009 Jul;124(1):3-20; quiz 1-2.
98. Humphries A, Wright NA. Colonic crypt organization and tumorigenesis. *Nat Rev Cancer.* 2008 Jun;8(6):415-24.
99. Sipos F, Valcz G, Molnar B. Physiological and pathological role of local and immigrating colonic stem cells. *World J Gastroenterol.* 2012 Jan 28;18(4):295-301.
100. Abdul Khalek FJ, Gallicano GI, Mishra L. Colon cancer stem cells. *Gastrointest Cancer Res.* 2010 Nov(Suppl 1):S16-23.
101. Wheeler PR, Zurbitt HG, Daniels VG. Barcelona: JIMS; 1987.
102. Vereecke L, Beyaert R, van Loo G. Enterocyte death and intestinal barrier maintenance in homeostasis and disease. *Trends Mol Med.* 2011 Oct;17(10):584-93.
103. Sambuy Y, Ferruzza S, Ranaldi G, De Angelis I. Intestinal cell culture models: applications in toxicology and pharmacology. *Cell Biol Toxicol.* 2001;17(4-5):301-17.
104. Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G, Scarino ML, Stamatii A, Zucco F. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol.* 2005 Jan;21(1):1-26.
105. Shangari N, Depeint F, Furrer R, Bruce WR, Popovic M, Zheng F, et al. A thermolyzed diet increases oxidative stress, plasma alpha-aldehydes and colonic inflammation in the rat. *Chem Biol Interact.* 2007 Aug 30;169(2):100-9.
106. Ignacio Barrasa J, Olmo N, Perez-Ramos P, Santiago-Gomez A, Lecona E, Turnay J, et al. Deoxycholic and chenodeoxycholic bile acids induce apoptosis via oxidative stress in human colon adenocarcinoma cells. *Apoptosis.* 2011 Oct;16(10):1054-67.
107. Kuntz S, Kunz C, Rudloff S. Carbonyl compounds methylglyoxal and glyoxal affect interleukin-8 secretion in intestinal cells by superoxide anion generation and activation of MAPK p38. *Mol Nutr Food Res.* 2010 Oct;54(10):1458-67.

108. Tsunada S, Iwakiri R, Noda T, Fujimoto K, Fuseler J, Rhoads CA, et al. Chronic exposure to subtoxic levels of peroxidized lipids suppresses mucosal cell turnover in rat small intestine and reversal by glutathione. *Dig Dis Sci*. 2003 Jan;48(1):210-22.
109. Rapin JR, Wiernsperger N. Possible links between intestinal permeability and food processing: A potential therapeutic niche for glutamine. *Clinics (Sao Paulo)*. 2010 Jun;65(6):635-43.
110. Wang N, Wang G, Hao J, Ma J, Wang Y, Jiang X, et al. Curcumin Ameliorates Hydrogen Peroxide-Induced Epithelial Barrier Disruption by Upregulating Heme Oxygenase-1 Expression in Human Intestinal Epithelial Cells. *Dig Dis Sci*. 2012 Mar 3.
111. Wei J, Feng J. Signaling pathways associated with inflammatory bowel disease. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*. 2010 Jun;4(2):105-17.
112. Rosillo MA, Sanchez-Hidalgo M, Cardeno A, de la Lastra CA. Protective effect of ellagic acid, a natural polyphenolic compound, in a murine model of Crohn's disease. *Biochem Pharmacol*. 2011 Oct 1;82(7):737-45.
113. Martin AR, Villegas I, Sanchez-Hidalgo M, de la Lastra CA. The effects of resveratrol, a phytoalexin derived from red wines, on chronic inflammation induced in an experimentally induced colitis model. *Br J Pharmacol*. 2006 Apr;147(8):873-85.
114. Halliwell B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochem J*. 2007 Jan 1;401(1):1-11.
115. O'Connor PM, Lapointe TK, Beck PL, Buret AG. Mechanisms by which inflammation may increase intestinal cancer risk in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2010 Aug;16(8):1411-20.
116. Terzic J, Grivennikov S, Karin E, Karin M. Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology*. 2010 Jun;138(6):2101-14 e5.
117. Zeki SS, Graham TA, Wright NA. Stem cells and their implications for colorectal cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2011 Feb;8(2):90-100.
118. Orlando FA, Tan D, Baltodano JD, Khoury T, Gibbs JF, Hassid VJ, et al. Aberrant crypt foci as precursors in colorectal cancer progression. *J Surg Oncol*. 2008 Sep 1;98(3):207-13.
119. Sena P, Roncucci L, Marzona L, Mariani F, Maffei S, Manenti A, et al. Altered expression of apoptosis biomarkers in human colorectal microadenomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010 Feb;19(2):351-7.
120. Pan MH, Lai CS, Wu JC, Ho CT. Molecular mechanisms for chemoprevention of colorectal cancer by natural dietary compounds. *Mol Nutr Food Res*. 2011 Jan;55(1):32-45.
121. Kim J, Ng J, Arozullah A, Ewing R, Llor X, Carroll RE, et al. Aberrant crypt focus size predicts distal polyp histopathology. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008 May;17(5):1155-62.
122. Raju J. Azoxymethane-induced rat aberrant crypt foci: relevance in studying chemoprevention of colon cancer. *World J Gastroenterol*. 2008 Nov 21;14(43):6632-5.
123. Khan R, Sultana S. Farnesol attenuates 1,2-dimethylhydrazine induced oxidative stress, inflammation and apoptotic responses in the colon of Wistar rats. *Chem Biol Interact*. 2011 Jul 15;192(3):193-200.
124. Corpet DE, Pierre F. How good are rodent models of carcinogenesis in predicting efficacy in humans? A systematic review and meta-analysis of colon chemoprevention in rats, mice and men. *Eur J Cancer*. 2005 Sep;41(13):1911-22.

125. Tammali R, Reddy AB, Ramana KV, Petrash JM, Srivastava SK. Aldose reductase deficiency in mice prevents azoxymethane-induced colonic preneoplastic aberrant crypt foci formation. *Carcinogenesis*. 2009 May;30(5):799-807.
126. Al-Numair KS, Waly MI, Ali A, Essa MM, Farhat MF, Alsaif MA. Dietary folate protects against azoxymethane-induced aberrant crypt foci development and oxidative stress in rat colon. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2011 Sep 1;236(9):1005-11.
127. Chiou YS, Tsai ML, Wang YJ, Cheng AC, Lai WM, Badmaev V, et al. Pterostilbene inhibits colorectal aberrant crypt foci (ACF) and colon carcinogenesis via suppression of multiple signal transduction pathways in azoxymethane-treated mice. *J Agric Food Chem*. 2010 Aug 11;58(15):8833-41.
128. Christudoss P, Selvakumar R, Pulimood AB, Fleming JJ, Mathew G. Tissue zinc levels in precancerous tissue in the gastrointestinal tract of azoxymethane (AOM)-treated rats. *Exp Toxicol Pathol*. 2008 Mar;59(5):313-8.
129. Visioli F, Bernaert H, Corti R, Ferri C, Heptinstall S, Molinari E, et al. Chocolate, lifestyle, and health. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2009 Apr;49(4):299-312.
130. Vinson JA, Proch J, Bose P, Muchler S, Taffera P, Shuta D, et al. Chocolate is a powerful ex vivo and in vivo antioxidant, an antiatherosclerotic agent in an animal model, and a significant contributor to antioxidants in the European and American Diets. *J Agric Food Chem*. 2006 Oct 18;54(21):8071-6.
131. D'Archivio M, Santangelo C, Scazzocchio B, Vari R, Filesi C, Masella R, et al. Modulatory effects of polyphenols on apoptosis induction: relevance for cancer prevention. *Int J Mol Sci*. 2008 Mar;9(3):213-28.
132. Martin MA, Serrano AB, Ramos S, Pulido MI, Bravo L, Goya L. Cocoa flavonoids up-regulate antioxidant enzyme activity via the ERK1/2 pathway to protect against oxidative stress-induced apoptosis in HepG2 cells. *J Nutr Biochem*. 2010 Mar;21(3):196-205.
133. Maskarinec G. Cancer protective properties of cocoa: a review of the epidemiologic evidence. *Nutr Cancer*. 2009;61(5):573-9.
134. Rusconi M, Conti A. Theobroma cacao L., the Food of the Gods: a scientific approach beyond myths and claims. *Pharmacol Res*. 2010 Jan;61(1):5-13.
135. Rios LY, Bennett RN, Lazarus SA, Remesy C, Scalbert A, Williamson G. Cocoa procyanidins are stable during gastric transit in humans. *Am J Clin Nutr*. 2002 Nov;76(5):1106-10.
136. Tsang C, Auger C, Mullen W, Bornet A, Rouanet JM, Crozier A, et al. The absorption, metabolism and excretion of flavan-3-ols and procyanidins following the ingestion of a grape seed extract by rats. *Br J Nutr*. 2005 Aug;94(2):170-81.
137. Ramiro-Puig E, Castell M. Cocoa: antioxidant and immunomodulator. *Br J Nutr*. 2009 Apr;101(7):931-40.
138. Granado-Serrano AB, Martin MA, Bravo L, Goya L, Ramos S. A diet rich in cocoa attenuates N-nitrosodiethylamine-induced liver injury in rats. *Food Chem Toxicol*. 2009 Oct;47(10):2499-506.
139. Cooper KA, Donovan JL, Waterhouse AL, Williamson G. Cocoa and health: a decade of research. *Br J Nutr*. 2008 Jan;99(1):1-11.
140. Heiss C, Kleinbongard P, Dejam A, Perre S, Schroeter H, Sies H, et al. Acute consumption of flavanol-rich cocoa and the reversal of endothelial dysfunction in smokers. *J Am Coll Cardiol*. 2005 Oct 4;46(7):1276-83.

141. Hollenberg NK, Fisher ND, McCullough ML. Flavanols, the Kuna, cocoa consumption, and nitric oxide. *J Am Soc Hypertens*. 2009 Mar-Apr;3(2):105-12.
142. Kang NJ, Lee KW, Lee DE, Rogozin EA, Bode AM, Lee HJ, et al. Cocoa procyanidins suppress transformation by inhibiting mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem*. 2008 Jul 25;283(30):20664-73.
143. Kim JE, Son JE, Jung SK, Kang NJ, Lee CY, Lee KW, et al. Cocoa polyphenols suppress TNF- α -induced vascular endothelial growth factor expression by inhibiting phosphoinositide 3-kinase (PI3K) and mitogen-activated protein kinase kinase-1 (MEK1) activities in mouse epidermal cells. *Br J Nutr*. 2010 Oct;104(7):957-64.
144. Lee DE, Kang NJ, Lee KM, Lee BK, Kim JH, Lee KW, et al. Cocoa polyphenols attenuate hydrogen peroxide-induced inhibition of gap-junction intercellular communication by blocking phosphorylation of connexin 43 via the MEK/ERK signaling pathway. *J Nutr Biochem*. 2010 Aug;21(8):680-6.
145. Granado-Serrano AB, Martin MA, Haegeman G, Goya L, Bravo L, Ramos S. Epicatechin induces NF- κ B, activator protein-1 (AP-1) and nuclear transcription factor erythroid 2p45-related factor-2 (Nrf2) via phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B (PI3K/AKT) and extracellular regulated kinase (ERK) signalling in HepG2 cells. *Br J Nutr*. 2010 Jan;103(2):168-79.
146. Cho ES, Jang YJ, Kang NJ, Hwang MK, Kim YT, Lee KW, et al. Cocoa procyanidins attenuate 4-hydroxynonenal-induced apoptosis of PC12 cells by directly inhibiting mitogen-activated protein kinase kinase 4 activity. *Free Radic Biol Med*. 2009 May 15;46(10):1319-27.
147. Ramiro-Puig E, Casadesus G, Lee HG, Zhu X, McShea A, Perry G, et al. Neuroprotective effect of cocoa flavonoids on in vitro oxidative stress. *Eur J Nutr*. 2009 Feb;48(1):54-61.
148. Erlejtman AG, Fraga CG, Oteiza PI. Procyanidins protect Caco-2 cells from bile acid- and oxidant-induced damage. *Free Radic Biol Med*. 2006 Oct 15;41(8):1247-56.
149. Erlejtman AG, Jaggers G, Fraga CG, Oteiza PI. TNF α -induced NF- κ B activation and cell oxidant production are modulated by hexameric procyanidins in Caco-2 cells. *Arch Biochem Biophys*. 2008 Aug 15;476(2):186-95.
150. Carnesecchi S, Schneider Y, Lazarus SA, Coehlo D, Gosse F, Raul F. Flavanols and procyanidins of cocoa and chocolate inhibit growth and polyamine biosynthesis of human colonic cancer cells. *Cancer Lett*. 2002 Jan 25;175(2):147-55.
151. Schuier M, Sies H, Illek B, Fischer H. Cocoa-related flavonoids inhibit CFTR-mediated chloride transport across T84 human colon epithelia. *J Nutr*. 2005 Oct;135(10):2320-5.
152. Nandakumar V, Singh T, Katiyar SK. Multi-targeted prevention and therapy of cancer by proanthocyanidins. *Cancer Lett*. 2008 Oct 8;269(2):378-87.
153. Shapiro H, Singer P, Halpern Z, Bruck R. Polyphenols in the treatment of inflammatory bowel disease and acute pancreatitis. *Gut*. 2007 Mar;56(3):426-35.
154. Shapiro H, Lev S, Cohen J, Singer P. Polyphenols in the prevention and treatment of sepsis syndromes: rationale and pre-clinical evidence. *Nutrition*. 2009 Oct;25(10):981-97.
155. Noe V, Penuelas S, Lamuela-Raventos RM, Permanyer J, Ciudad CJ, Izquierdo-Pulido M. Epicatechin and a cocoa polyphenolic extract modulate gene expression in human Caco-2 cells. *J Nutr*. 2004 Oct;134(10):2509-16.
156. Erdelyi I, Levenkova N, Lin EY, Pinto JT, Lipkin M, Quimby FW, et al. Western-style diets induce oxidative stress and dysregulate immune responses in the colon in a mouse model of sporadic colon cancer. *J Nutr*. 2009 Nov;139(11):2072-8.

157. Uribarri J, Woodruff S, Goodman S, Cai W, Chen X, Pyzik R, et al. Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet. *J Am Diet Assoc.* 2010 Jun;110(6):911-16 e12.
158. Besaratinia A, Pfeifer GP. A review of mechanisms of acrylamide carcinogenicity. *Carcinogenesis.* 2007 Mar;28(3):519-28.
159. Kurien BT. Comment on Curcumin attenuates acrylamide-induced cytotoxicity and genotoxicity in HepG2 cells by ROS scavenging. *J Agric Food Chem.* 2009 Jun 24;57(12):5644-6.
160. Pierini R, Gee JM, Belshaw NJ, Johnson IT. Flavonoids and intestinal cancers. *Br J Nutr.* 2008 May;99 E Suppl 1:ES53-9.
161. Martin MA, Ramos S, Mateos R, Granado Serrano AB, Izquierdo-Pulido M, Bravo L, et al. Protection of human HepG2 cells against oxidative stress by cocoa phenolic extract. *J Agric Food Chem.* 2008 Sep 10;56(17):7765-72.
162. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin.* 2009 Jul-Aug;59(4):225-49.
163. Bartsch H, Nair J. Potential role of lipid peroxidation derived DNA damage in human colon carcinogenesis: studies on exocyclic base adducts as stable oxidative stress markers. *Cancer Detect Prev.* 2002;26(4):308-12.
164. Miller PE, Lesko SM, Muscat JE, Lazarus P, Hartman TJ. Dietary patterns and colorectal adenoma and cancer risk: a review of the epidemiological evidence. *Nutr Cancer.* 2010;62(4):413-24.
165. Rice-Evans C. Flavonoids and isoflavones: absorption, metabolism, and bioactivity. *Free Radic Biol Med.* 2004 Apr 1;36(7):827-8.
166. Pan MH, Chiou YS, Wang YJ, Ho CT, Lin JK. Multistage carcinogenesis process as molecular targets in cancer chemoprevention by epicatechin-3-gallate. *Food Funct.* 2011 Feb;2(2):101-10.
167. Alia M, Mateos R, Ramos S, Lecumberri E, Bravo L, Goya L. Influence of quercetin and rutin on growth and antioxidant defense system of a human hepatoma cell line (HepG2). *Eur J Nutr.* 2006 Feb;45(1):19-28.
168. Pereira-Caro G, Sarria B, Madrona A, Espartero JL, Goya L, Bravo L, et al. Alkyl hydroxytyrosyl ethers show protective effects against oxidative stress in HepG2 cells. *J Agric Food Chem.* 2011 Jun 8;59(11):5964-76.
169. Dearfield KL, Douglas GR, Ehling UH, Moore MM, Sega GA, Brusick DJ. Acrylamide: a review of its genotoxicity and an assessment of heritable genetic risk. *Mutat Res.* 1995 Aug;330(1-2):71-99.
170. Naruszewicz M, Zapolska-Downar D, Kosmider A, Nowicka G, Kozłowska-Wojciechowska M, Vikstrom AS, et al. Chronic intake of potato chips in humans increases the production of reactive oxygen radicals by leukocytes and increases plasma C-reactive protein: a pilot study. *Am J Clin Nutr.* 2009 Mar;89(3):773-7.
171. Zhang X, Zhao C, Jie B. Various dietary polyunsaturated fatty acids modulate acrylamide-induced preneoplastic urothelial proliferation and apoptosis in mice. *Exp Toxicol Pathol.* 2010 Jan;62(1):9-16.
172. Chen JH, Wu KY, Chiu IM, Tsou TC, Chou CC. Acrylamide-induced astroglial and apoptotic responses in human astrocytoma cells. *Toxicol In Vitro.* 2009 Aug;23(5):855-61.

173. Cao J, Liu Y, Jia L, Jiang LP, Geng CY, Yao XF, et al. Curcumin attenuates acrylamide-induced cytotoxicity and genotoxicity in HepG2 cells by ROS scavenging. *J Agric Food Chem*. 2008 Dec 24;56(24):12059-63.
174. Circu ML, Rodriguez C, Maloney R, Moyer MP, Aw TY. Contribution of mitochondrial GSH transport to matrix GSH status and colonic epithelial cell apoptosis. *Free Radic Biol Med*. 2008 Mar 1;44(5):768-78.
175. Ekshyyan O, Aw TY. Decreased susceptibility of differentiated PC12 cells to oxidative challenge: relationship to cellular redox and expression of apoptotic protease activator factor-1. *Cell Death Differ*. 2005 Aug;12(8):1066-77.
176. Li SX, Cui N, Zhang CL, Zhao XL, Yu SF, Xie KQ. Effect of subchronic exposure to acrylamide induced on the expression of bcl-2, bax and caspase-3 in the rat nervous system. *Toxicology*. 2006 Jan 5;217(1):46-53.
177. Sumizawa T, Igisu H. Apoptosis induced by acrylamide in SH-SY5Y cells. *Arch Toxicol*. 2007 Apr;81(4):279-82.
178. Zhou Y, Wang Q, Evers BM, Chung DH. Signal transduction pathways involved in oxidative stress-induced intestinal epithelial cell apoptosis. *Pediatr Res*. 2005 Dec;58(6):1192-7.
179. Romier B, Schneider YJ, Larondelle Y, During A. Dietary polyphenols can modulate the intestinal inflammatory response. *Nutr Rev*. 2009 Jul;67(7):363-78.
180. Rodriguez-Ramiro I, Martin MA, Ramos S, Bravo L, Goya L. Comparative effects of dietary flavanols on antioxidant defences and their response to oxidant-induced stress on Caco2 cells. *Eur J Nutr*. 2010 Nov 3.
181. Corcuera LA, Amezcua S, Arbillaga L, Vettorazzi A, Tourino S, Torres JL, et al. A polyphenol-enriched cocoa extract reduces free radicals produced by mycotoxins. *Food Chem Toxicol*. 2012 Mar;50(3-4):989-95.
182. Romero L, Andrews K, Ng L, O'Rourke K, Maslen A, Kirby G. Human GSTA1-1 reduces c-Jun N-terminal kinase signalling and apoptosis in Caco-2 cells. *Biochem J*. 2006 Nov 15;400(1):135-41.
183. Dobrowolski P, Huet P, Karlsson P, Eriksson S, Tomaszewska E, Gawron A, et al. Potato fiber protects the small intestinal wall against the toxic influence of acrylamide. *Nutrition*. 2012 Apr;28(4):428-35.
184. Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat Prod Rep*. 2009 Aug;26(8):1001-43.
185. Rodriguez-Ramiro I, Ramos S, Bravo L, Goya L, Martin MA. Procyanidin B2 and a cocoa polyphenolic extract inhibit acrylamide-induced apoptosis in human Caco-2 cells by preventing oxidative stress and activation of JNK pathway. *J Nutr Biochem*. 2011 Dec;22(12):1186-94.
186. Ritchie KJ, Walsh S, Sansom OJ, Henderson CJ, Wolf CR. Markedly enhanced colon tumorigenesis in Apc(Min) mice lacking glutathione S-transferase Pi. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Dec 8;106(49):20859-64.
187. Lii CK, Tsai CW, Wu CC. Garlic allyl sulfides display differential modulation of rat cytochrome P450 2B1 and the placental form glutathione S-transferase in various organs. *J Agric Food Chem*. 2006 Jul 12;54(14):5191-6.
188. Soyalan B, Minn J, Schmitz HJ, Schrenk D, Will F, Dietrich H, et al. Apple juice intervention modulates expression of ARE-dependent genes in rat colon and liver. *Eur J Nutr*. 2011 Mar;50(2):135-43.

189. Li W, Kong AN. Molecular mechanisms of Nrf2-mediated antioxidant response. *Mol Carcinog*. 2009 Feb;48(2):91-104.
190. Aleksunes LM, Manautou JE. Emerging role of Nrf2 in protecting against hepatic and gastrointestinal disease. *Toxicol Pathol*. 2007 Jun;35(4):459-73.
191. Saw CL, Wu Q, Kong AN. Anti-cancer and potential chemopreventive actions of ginseng by activating Nrf2 (NFE2L2) anti-oxidative stress/anti-inflammatory pathways. *Chin Med*. 2010;5:37.
192. Boettler U, Volz N, Pahlke G, Teller N, Kotyczka C, Somoza V, et al. Coffees rich in chlorogenic acid or N-methylpyridinium induce chemopreventive phase II-enzymes via the Nrf2/ARE pathway in vitro and in vivo. *Mol Nutr Food Res*. 2011 May;55(5):798-802.
193. Leoncini E, Malaguti M, Angeloni C, Motori E, Fabbri D, Hrelia S. Cruciferous vegetable phytochemical sulforaphane affects phase II enzyme expression and activity in rat cardiomyocytes through modulation of Akt signaling pathway. *J Food Sci*. 2011 Sep;76(7):H175-81.
194. Shan Y, Wang X, Wang W, He C, Bao Y. p38 MAPK plays a distinct role in sulforaphane-induced up-regulation of ARE-dependent enzymes and down-regulation of COX-2 in human bladder cancer cells. *Oncol Rep*. 2010 Apr;23(4):1133-8.
195. Hou DX, Kumamoto T. Flavonoids as protein kinase inhibitors for cancer chemoprevention: direct binding and molecular modeling. *Antioxid Redox Signal*. 2010 Sep 1;13(5):691-719.
196. Tomaru M, Takano H, Osakabe N, Yasuda A, Inoue K, Yanagisawa R, et al. Dietary supplementation with cacao liquor proanthocyanidins prevents elevation of blood glucose levels in diabetic obese mice. *Nutrition*. 2007 Apr;23(4):351-5.
197. Rodriguez-Ramiro I, Ramos S, Bravo L, Goya L, Martin MA. Procyanidin B2 induces Nrf2 translocation and glutathione S-transferase P1 expression via ERKs and p38-MAPK pathways and protect human colonic cells against oxidative stress. *Eur J Nutr*. 2011 Nov 1.
198. Lecumberri E, Goya L, Mateos R, Alia M, Ramos S, Izquierdo-Pulido M, et al. A diet rich in dietary fiber from cocoa improves lipid profile and reduces malondialdehyde in hypercholesterolemic rats. *Nutrition*. 2007 Apr;23(4):332-41.
199. Ramiro-Puig E, Perez-Cano FJ, Ramos-Romero S, Perez-Berezo T, Castellote C, Permanyer J, et al. Intestinal immune system of young rats influenced by cocoa-enriched diet. *J Nutr Biochem*. 2008 Aug;19(8):555-65.
200. Matsui N, Ito R, Nishimura E, Yoshikawa M, Kato M, Kamei M, et al. Ingested cocoa can prevent high-fat diet-induced obesity by regulating the expression of genes for fatty acid metabolism. *Nutrition*. 2005 May;21(5):594-601.
201. Pritchard CC, Grady WM. Colorectal cancer molecular biology moves into clinical practice. *Gut*. 2011 Jan;60(1):116-29.
202. Chiou YS, Tsai ML, Nagabhushanam K, Wang YJ, Wu CH, Ho CT, et al. Pterostilbene is more potent than resveratrol in preventing azoxymethane (AOM)-induced colon tumorigenesis via activation of the NF-E2-related factor 2 (Nrf2)-mediated antioxidant signaling pathway. *J Agric Food Chem*. 2011 Mar 23;59(6):2725-33.
203. Ashokkumar P, Sudhandiran G. Protective role of luteolin on the status of lipid peroxidation and antioxidant defense against azoxymethane-induced experimental colon carcinogenesis. *Biomed Pharmacother*. 2008 Nov;62(9):590-7.

204. Shimizu M, Shirakami Y, Sakai H, Adachi S, Hata K, Hirose Y, et al. (-)-Epigallocatechin gallate suppresses azoxymethane-induced colonic premalignant lesions in male C57BL/KsJ-db/db mice. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2008 Sep;1(4):298-304.
205. Chung CS, Jiang Y, Cheng D, Birt DF. Impact of adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor gene in human colon cancer cell lines on cell cycle arrest by apigenin. *Mol Carcinog*. 2007 Sep;46(9):773-82.
206. Cheung KL, Khor TO, Huang MT, Kong AN. Differential in vivo mechanism of chemoprevention of tumor formation in azoxymethane/dextran sodium sulfate mice by PEITC and DBM. *Carcinogenesis*. 2010 May;31(5):880-5.
207. Fu M, Wang C, Li Z, Sakamaki T, Pestell RG. Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions. *Endocrinology*. 2004 Dec;145(12):5439-47.
208. Xavier CP, Lima CF, Preto A, Seruca R, Fernandes-Ferreira M, Pereira-Wilson C. Luteolin, quercetin and ursolic acid are potent inhibitors of proliferation and inducers of apoptosis in both KRAS and BRAF mutated human colorectal cancer cells. *Cancer Lett*. 2009 Aug 28;281(2):162-70.
209. Takahashi M, Wakabayashi K. Gene mutations and altered gene expression in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rodents. *Cancer Sci*. 2004 Jun;95(6):475-80.
210. Velmurugan B, Singh RP, Agarwal R, Agarwal C. Dietary-feeding of grape seed extract prevents azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci formation in fischer 344 rats. *Mol Carcinog*. 2010 Jul;49(7):641-52.
211. Lai CS, Tsai ML, Cheng AC, Li S, Lo CY, Wang Y, et al. Chemoprevention of colonic tumorigenesis by dietary hydroxylated polymethoxyflavones in azoxymethane-treated mice. *Mol Nutr Food Res*. 2011 Feb;55(2):278-90.
212. Mitsuyama K, Suzuki A, Tomiyasu N, Tsuruta O, Kitazaki S, Takeda T, et al. Pro-inflammatory signaling by Jun-N-terminal kinase in inflammatory bowel disease. *Int J Mol Med*. 2006 Mar;17(3):449-55.

El estrés oxidativo y la inflamación son dos de las causas más frecuentes relacionadas con el inicio y el desarrollo de numerosas enfermedades. En los últimos años, numerosos estudios de prevención nutricional han suscitado un gran interés por investigar los efectos beneficiosos de los compuestos bioactivos de los alimentos frente a estas enfermedades. En concreto, se ha descrito que los flavonoides pueden proteger del estrés oxidativo a través de su actividad antioxidante y de su capacidad de modular las vías de señales celulares. El cacao supone una importante fuente de procianidinas, un tipo de flavonoides de alto peso molecular y de limitada absorción intestinal. Sin embargo, a pesar de sus propiedades y de su amplia aceptación, son pocos los estudios que se han centrado en investigar los efectos de los flavonoides del cacao en el epitelio de la mucosa intestinal. En este estudio se han puesto de manifiesto los mecanismos moleculares de protección de los flavonoides del cacao en el colon frente al estrés oxidativo y la inflamación tanto en estudios *in vitro*, utilizando modelos celulares, como *in vivo*, con animales de experimentación.

